

**Títol del treball:**

**Caracterització de l'adhesió cel·lular en *stents* coronaris**

---

Estudiant: Paula Cano Calvo

Grau en Biologia

Correu electrònic: paaula.cano@gmail.com

Tutor: Carles Abellà Atmetller

Cotutor\*: Teresa Puig Miquel; Joaquim de Ciurana Gay

Empresa / institució: Grup de Recerca en Noves Diances Terapèutiques (TargetsLab), Departament de Ciències Mèdiques (UdG); Grup de Recerca en Enginyeria de Producte, Procés i Producció, Departament d'Enginyeria Mecànica i Construcció Industrial (UdG)

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Carles Abellà Ametller

Nom del cotutor\*: Teresa Puig Miquel; Joaquim de Ciurana Gay

Empresa / institució: Grup de Recerca en Noves Diances Terapèutiques (TargetsLab), Departament de Ciències Mèdiques (UdG); Grup de Recerca en Enginyeria de Producte, Procés i Producció, Departament d'Enginyeria Mecànica i Construcció Industrial (UdG)

Correu(s) electrònic(s):

- carles.abella@udg.edu
- teresa.puig@udg.edu
- quim.ciurana@udg.edu

\* si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

## RESUM

Els *stents* cardiovasculars bioreabsorbibles (SCB) es van desenvolupar per superar les limitacions dels *stents* permanents. Ofereixen el potencial d'incrementar les taxes de permeabilitat a llarg termini i donen suport només el temps necessari perquè l'artèria es recompongui per ella mateixa. Idealment, un SCB hauria de complir 3 requisits: 1) la seva degradació ha de tenir la mínima toxicitat pel cos humà, 2) la seva taxa de degradació ha de ser equivalent a la taxa de recuperació del teixit vascular, 3) el SCB ha d'induir una ràpida endotelització. Mentre que els dos primers requeriments han estat àmpliament estudiats, l'últim requeriment ha passat més desapercebut.

El treball present prova diferents mètodes d'esterilització en els *stents* i estudia els efectes de la geometria i el material amb el que els *stents* han estat fabricats, Policaprolactona (PCL) o Àcid Polilàctid (PLA), sobre la proliferació cel·lular.

S'han aplicat 3 mètodes d'esterilització als *stents*: etanol 70%, làmpada de llum ultraviolada i antibiòtics. Tots els tractaments han durat diferents temps: 0.5h, 1h, 8h i 16h. Després d'aplicar els diferents tractaments, s'ha afegit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementat, amb vermell fenol (indicador de pH) i sense penicil·lina/estreptomina. Els signes d'infecció s'indiquen amb el canvi del medi a color groc i l'augment de la opacitat del medi. Excepte en el tractament amb etanol, totes les mostres tractades menys de 8 hores presenten signes d'infecció, mentre que les mostres tractades entre 8 i 16 hores mostren una esterilització completa. Per tant, la metodologia escollida per esterilitzar els *stents* ha estat etanol 70% durant tota la nit i llum ultraviolada durant 20 minuts.

Per caracteritzar el comportament cel·lular en els *stents*, les peces esterilitzades s'han posicionat en una placa no adherent i s'han cultivat amb una concentració final de 20000 Fibroblasts de ratolí (3T3) per *stent*. La proliferació cel·lular s'ha testat amb un assaig de MTT. Els resultats mostren una forta influència de la taxa de flux, el número de cel·les i el material sobre el creixement dels 3T3 ( $p < 0.05$ ), mentre que la geometria dels *stents* no presenta una influència significativa. L'adhesió cel·lular en els *stents* s'ha visualitzat mitjançant un microscopi làser confocal.

## RESUMEN

Los *stents* cardiovasculares bioreabsorbibles (SCB) se desarrollaron para superar las limitaciones de los *stents* permanentes. Ofrecen el potencial de incrementar las tasas de permeabilidad a largo plazo y dan soporte sólo el tiempo necesario para que la arteria se recomponga por ella misma. Idealmente, un SCB debería cumplir 3 requisitos: 1) su degradación debe tener la mínima toxicidad para el cuerpo humano, 2) su tasa de degradación debe ser equivalente a la tasa de recuperación del tejido vascular, 3) el SCB debe inducir una rápida endotelización. Mientras que los dos primeros requisitos han estado ampliamente estudiados, el último de ellos ha pasado más desapercibido.

El trabajo presente prueba diferentes métodos de esterilización en los *stents* y estudia los efectos de la geometría y el material con el que los *stents* han estado fabricados, Policaprolactona (PCL) i Ácido Poliláctido (PLA), sobre la proliferación celular.

Se han aplicado 3 métodos de esterilización en los *stents*: etanol 70%, lámpara de luz ultravioletada i antibióticos. Todos los tratamientos han durado diferentes tiempos: 0.5, 1h, 8h i 16h. Después de aplicar los distintos tratamientos, se ha añadido *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado, con rojo fenol (indicador de pH) y sin penicilina/estreptomicina. Los signos de infección se indican con un cambio del medio a color amarillo y un incremento de la opacidad del medio. Exceptuando el tratamiento con etanol 70%, todas las muestras tratadas menos de 8 horas presentan signos de infección, mientras que las muestras tratadas entre 8 y 16 horas muestran una esterilización completa. Por lo tanto, la metodología escogida para esterilizar los *stents* ha sido etanol 70% durante toda la noche y luz ultravioletada durante 20 minutos.

Para caracterizar el comportamiento celular en los *stents*, las piezas esterilizadas se han posicionado en una placa no adherente y se han cultivado con 20000 Fibroblastos de ratón (3T3) por *stent*. La proliferación celular se ha testado con un ensayo de MTT. Los resultados muestran una fuerte influencia de la tasa de flujo, el número de celdas y el material sobre el crecimiento de los 3T3 ( $p < 0.05$ ), mientras que la geometría de los *stents* no presenta una influencia significativa. La adhesión celular en los *stents* se ha visualizado mediante un microscopio láser confocal.

## SUMMARY

Cardiovascular bioresorbable stents (CBS) were introduced to overcome the limitations of permanent stents. They offer the potential to improve long-term patency rates and provide support just long enough for the artery to heal itself. Ideally, CBS should meet three requirements: 1) CBS degradation should have the minimum toxicity to the body, 2) CBS degradation rate should match the recovery rate of vascular tissue, and 3) CBS should induce rapid endothelialisation. While the first and second requirements have been deeply studied the last requirement had been overlooked.

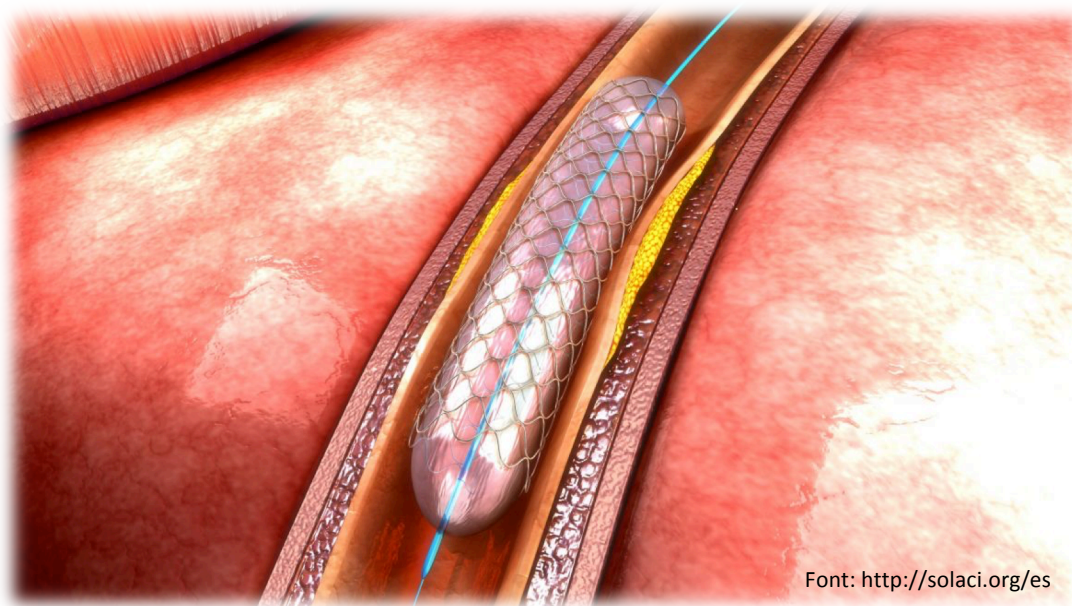
This work tests different sterilization methods on the stents and studies the effects of stents geometry and material, such as Polycaprolactone (PCL) or Polylactide Acid (PLA), over the cell proliferation.

Three sterilization methods have been applied such as ethanol 70%, ultraviolet lamp and antibiotic sterilization. All treatments have been performed for different times: 0.5h, 1h, 8h and 16h. Supplemented Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with phenol red (pH indicator) and without penicillin/streptomycin has been added after different treatments. Remaining infection is indicated by yellowing of the media and increased of media opacity. With regards to Ethanol treatment, all samples treated below 8 hours show signs of infection, while samples treated during 8 and 16 hours exhibit a complete sterilization. Therefore, subsequent chosen methodology for sterilization has been Ethanol 70% overnight and Ultraviolet Lamp 20 min.

To elucidate cell behaviour on stent, sterilized parts has been placed in non-adherent microplates and seeded with a final concentration of 20000 Murine 3T3 Fibroblasts per stent. Cell proliferation has been tested by MTT assay. Results show a strong influence of flow rate, number of cells and material over 3T3 growth ( $p < 0.05$ ), while stent cell geometry did not show significant influence. Cell adhesion in the stents has been visualized by means of a confocal laser microscope.

# Caracterització de l'adhesió cel·lular en *stents* coronaris

Paula Cano Calvo



Font: <http://solaci.org/es>

Co-tutors: Dra. Teresa Puig i Dr. Joaquim Ciurana

Tutor acadèmic: Carles Abellà Ametller

Memòria del Treball de Final de Grau

Grau en Biologia

Maig del 2018

## Agraïments

*En primer lloc, gràcies a la Dra. Teresa Puig i al Dr. Joaquim Ciurana, cotutors del present treball, per donar-me l'oportunitat d'iniciar aquest projecte i formar-me en el món de la biologia cel·lular. Gràcies per confiar en mi.*

*Gràcies també al Dr. Carles Abellà per tutoritzar aquest treball i seguir el meu progrés. Agraïxo de tot cor els teus consells i sobretot, la teva manera de fer-me veure que les coses s'han de treballar.*

*Gràcies en especial a en Marc Rabionet i a l'Antonio Guerra, per guiar-me i ajudar-me en aquest projecte. M'heu ensenyat a sentir passió pel que fem. Sense vosaltres el desenvolupament d'aquest treball no hagués estat possible. Gràcies per la dedicació i la paciència.*

*Gràcies a tots els companys de TargetsLab, per generar un ambient de treball tranquil i per fer que em sentís en tot moment com si fos a casa. Gràcies també, per l'ajuda que indirectament m'heu prestat.*

*I finalment, gràcies a la família i amics per la paciència. Espero que totes aquestes aportacions es vegi reflectides en el present treball.*

## Índex

<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>5</b>
<b>CARDIOPATIA ISQUÈMICA I TRACTAMENTS</b>	<b>5</b>
<b>ELS STENTS CORONARIS</b>	<b>6</b>
STENTS ALLIBERADORS DE FÀRMACS	6
STENTS BIODEGRADABLES	7
<b>PROCESSOS D'ESTERILITZACIÓ</b>	<b>9</b>
<b>OBJECTIVES</b>	<b>10</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>11</b>
<b>1. FABRICACIÓ DELS STENTS</b>	<b>11</b>
<b>2. EL MATERIAL</b>	<b>14</b>
<b>2. LES LÍNIES CEL·LULARS</b>	<b>14</b>
<b>3. ESTERILITZACIÓ DELS STENTS</b>	<b>15</b>
3.1. ANÀLISI PREVIS A L'ESTERILITZACIÓ	15
3.2. TRACTAMENT AMB ETANOL	16
3.3. TRACTAMENT AMB LLUM ULTRAVIOLADA	16
3.4. TRACTAMENT AMB ANTIBIÒTICS	16
3.5. CONTROLS	17
<b>4. PROVES DE DENSITAT CEL·LULAR</b>	<b>17</b>
<b>5. CULTIU CEL·LULAR EN STENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. PROVES AMB MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA CONFOCAL</b>	<b>19</b>
<b>7. ÈTICA I SOSTENIBILITAT</b>	<b>20</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>21</b>
<b>1. PROVES D'ESTERILITZACIÓ DELS STENTS</b>	<b>21</b>
<b>2. PROVES DE DENSITAT CEL·LULAR</b>	<b>22</b>
<b>3. CULTIU CEL·LULAR DELS STENTS</b>	<b>23</b>
<b>4. FOTOGRAFIES OBTINGUDES PER MICROSCÒPIA LÀSER CONFOCAL</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>29</b>

## Índex de Figures

<b>Figura 1.</b> Angioplàstia coronària (extret on-line via: <a href="http://www.icba.com.ar/hemodinamia/stent.html">http://www.icba.com.ar/hemodinamia/stent.html</a> )	5
<b>Figura 2.</b> Stent coronari metàl·lic (extret on-line via: <a href="https://www.bostonscientific.com/en-US/medical-specialties/gastroenterology/resources/image-library/biliary-metal-stent-images.html">https://www.bostonscientific.com/en-US/medical-specialties/gastroenterology/resources/image-library/biliary-metal-stent-images.html</a> )	6
<b>Figura 3.</b> Stent coronari bioreabsorbible (SCB) (extret on-line via: <a href="https://www.dicardiology.com/content/new-bioresorbable-stent-uses-technology-appear-angiographic-x-ray">https://www.dicardiology.com/content/new-bioresorbable-stent-uses-technology-appear-angiographic-x-ray</a> )	7
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la policaprolactona (PCL) (extret on-line via: <a href="https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/181609?lang=es&amp;region=ES">https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/181609?lang=es&amp;region=ES</a> )	8
<b>Figura 5.</b> Estructura química de l'àcid polilàctic (PLA) (extret on-line via: <a href="https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/38534?lang=es&amp;region=ES&amp;gclid=EAlaIQobChMIzq6FvNIP2wIVBjVCh0ZCgOOEAAAYASAAEgLSrCPD_BwE">https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/38534?lang=es&amp;region=ES&amp;gclid=EAlaIQobChMIzq6FvNIP2wIVBjVCh0ZCgOOEAAAYASAAEgLSrCPD_BwE</a> )	8
<b>Figura 6.</b> Dibuix de tres geometries de cel·les diferents utilitzades per fabricar els stents. S'han fabricat 9 stents diferents de cada geometria.	11
<b>Figura 7.</b> Dibuix de dos stents fabricats amb dos materials diferents: PCL i PLA	11
<b>Figura 8.</b> Imatges al microscopi dels 27 stents diferents utilitzats en aquest treball. Les 9 primeres geometries corresponen a la geometria A, de la 10 a la 18 a la geometria B i de la 19 a la 27 a la geometria C. Cada fila correspon al número de cel·les (4, 6 i 8 respectivament). Cada columna correspon a la taxa de flux.	13
<b>Figura 9. (a)</b> Impressora 3D fabricada pel GREP i utilitzada per la fabricació dels diferents stents. Fotografia pròpia. <b>(b)</b> Fused Deposition Modelling (FDM); metodologia emprada per la impressora.	13
<b>Figura 10.</b> Imatge de fibroblasts de ratolí (3T3) realitzada amb un microscopi òptic confocal (fotografia pròpia) a 40 augments.	14
<b>Figura 11.</b> Imatge de cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC) realitzada amb un microscopi òptic confocal (fotografia pròpia) a 40 augments.	15
<b>Figura 12. (a)</b> Mostres de stents en medi DMEM a 0h. El medi es troba en el seu color original, vermell. <b>(b)</b> Mostres de stents en medi DMEM passades 24h. El medi ha virat a color groc.	16
<b>Figura 13.</b> Disseny experimental. Stents amb medi DMEM esterilitzats amb diferents tractaments durant diferents temps d'exposició al tractament (fotografia pròpia).	17
<b>Figura 14.</b> Disseny experimental de les proves de densitat cel·lular.	17
<b>Figura 15.</b> Disseny experimental del cultiu cel·lular en stents.	18
<b>Figura 16.</b> Microscopi Làser confocal utilitzat per observar fibroblasts (3T3) adherits a la cel·la d'un stent. Es troba a la Unitat de Biotecnologia i Biomedicina dels Serveis Tècnics de la Universitat de Girona (fotografia pròpia).	20
<b>Figura 17.</b> Resultats de les proves d'esterilitat. ET = etanol 70%; PIS = penicil·lina/estreptomycina; UVA = llum ultraviolada; Control - = medi sense stent; Control + = medi amb stent sense esterilitzar (fotografia pròpia).	21
<b>Figura 18.</b> Gràfics resultants de les proves de densitat cel·lular.	22
<b>Figura 19.</b> Resultats finals del cultiu dels stents amb fibroblasts de ratolí (3T3). Els valors estan calculats en funció de l'absorbància obtinguda en el control 2D. Cada barra és la mitjana del % de proliferació cel·lular respecte el control 2D obtingut en cadascuna de les 3 rèpliques realitzades.	23
<b>Figura 20.</b> Resultats del programa estadístic Quantum XL. <b>(a)</b> Efecte de la geometria de les cel·les en la proliferació cel·lular ( $p > 0.05$ ). <b>(b)</b> Efecte de la taxa de flux en la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ). <b>(c)</b> Efecte del número de cel·les en la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ). <b>(d)</b> Efecte del material en la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ).	23



**Figura 21.** Resultats finals del cultiu dels stents amb cèl·lules endotelials (HUVEC). Els valors estan calculats en funció de l'absorbància obtinguda en el control 2D. \_\_\_\_\_ 24

**Figura 22.** Fotografies realitzades amb el Microscopi Làser Confocal dels Serveix Tècnics de la Universitat de Girona. **(a)** Fibroblasts (3T3) cultivats en plaques adherents (2D). **(b)** Fibroblasts (3T3) cultivats en una cel·la de PCL. Els punts blaus al voltant de la cel·la indiquen els nuclis de les cèl·lules adherides al stent. **(c)** Fibroblasts (3T3) cultivats en una cel·la de PLA. La taca vermella indica el citoplasma de les cèl·lules adherides al stent. \_\_\_\_\_ 25

## Índex de Taules

**Taula 1.** Geometria de les cel·les ( $C_G$ ), nombre de cel·les ( $N_C$ ) i taxa de flux per PCL ( $F_{R_{PCL}}$ ) i per PLA ( $F_{R_{PLA}}$ ) de les 27 geometries diferents de *stents* (G). La taxa de flux (FR) es va escollir per obtenir el mateix grossor de stent (Sw) per PCL i PLA. \_\_\_\_\_ 11

**Taula 2.** Propietats dels materials PCL i PLA. \_\_\_\_\_ 14

**Taula 3.** Superfícies dels *stents* \_\_\_\_\_ 26

## Introducció

### Cardiopatia isquèmica i tractaments

La cardiopatia isquèmica és la causa més freqüent de mort en el món occidental; un 35% dels habitants d'EEUU moren per aquesta causa (Guyton & Hall, 2011). Aquesta patologia és conseqüència d'un flux coronari insuficient, que debilita progressivament el bombeig cardíac, i/o d'una oclusió coronària aguda.

L'**arteriosclerosi** és el procés pel qual s'acumula colesterol i altres grasses per sota de l'endoteli de les artèries, formant el que es coneix com plaques arterioscleròtiques. És la principal causa de l'obstrucció d'artèries de tot el cos. En ocasions, l'arteriosclerosi pot derivar en una oclusió aguda de l'artèria coronària. La placa arterioscleròtica pot penetrar l'endoteli del vas, contactant directament amb la sang i produir un coàgul sanguini anomenat trombe (Guyton & Hall, 2011).

Les malalties coronàries poden tractar-se quirúrgicament. El mètode més convencional és l'aplicació d'inserts intravenosos (vasos sanguinis d'una altra part del cos) que desvien la sang de l'artèria que es troba bloquejada. En els últims 30 anys, s'ha començat a utilitzar un tractament menys invasiu, ja que el mètode anterior requereix l'obertura del tòrax i una operació a cor obert (StayWell Company, 2016). Aquest tractament menys invasiu s'anomena **angioplàstia coronària** (Figura 1) i s'utilitza per obrir vasos sanguinis parcialment obstruïts abans de la seva obstrucció completa. Es basa en introduir sota control radiogràfic un tub llarg i prim anomenat catèter (d'1 mm de diàmetre, aproximadament) amb un globus a la punta que es condueix fins arribar a la zona de l'artèria on se situa l'obstrucció parcial. Després, s'infla el globus a alta pressió i aquest expandeix l'artèria augmentant el flux sanguini unes tres o quatre vegades. Aquesta operació alleuja els símptomes de la majoria de pacients durant uns anys, però en molts casos l'artèria pot es tornar a tancar (Guyton & Hall, 2011).

Actualment, s'estan desenvolupant procediments més novells de revascularització de les artèries coronàries arterioscleròtiques, com la col·locació d'una petita malla metàl·lica anomenada **stent** a l'interior de l'artèria coronària dilatada mitjançant angioplàstia. Aquest **stent** executa una força contra la paret endotelial que permet que l'artèria quedi oberta un període de temps més llarg i evitar així la reestenosis (Guyton & Hall, 2011).

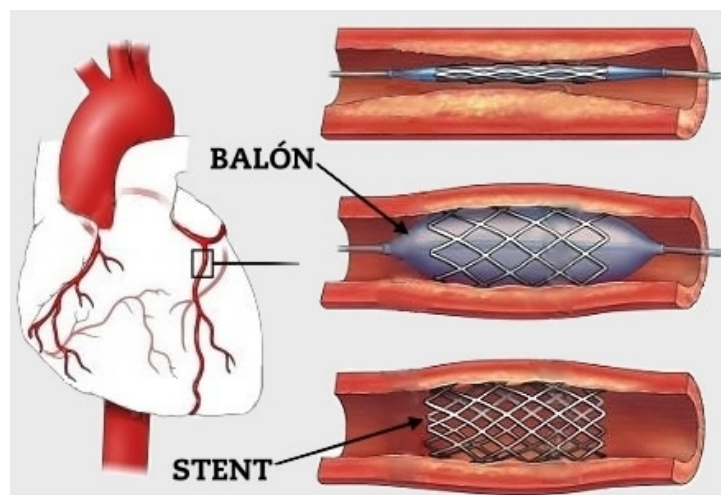


Figura 1. Angioplàstia coronària (extret on-line via: <http://www.icba.com.ar/hemodinamia/stent.html>)

## Els stents coronaris

Els *stents* coronaris representen el major avenç en l'estudi del tractament de la cardiopatia coronària o malaltia de les artèries coronàries, el tipus de malaltia cardiovascular més comú (Wang et al., 2006). Un *stent* consisteix en una malla metàl·lica de forma tubular (Figura 2). Quan s'implanta dins d'una artèria coronària actua com a suport per mantenir obert el vas sanguini, augmentant així el flux sanguini cap al múscul cardíac. Normalment, els *stents* es col·loquen conjuntament amb una angioplàstia coronària. De fet, al 80% dels pacients que se sotmeten a una angioplàstia coronària també se'ls introdueix un *stent* (Texas Heart Institute).

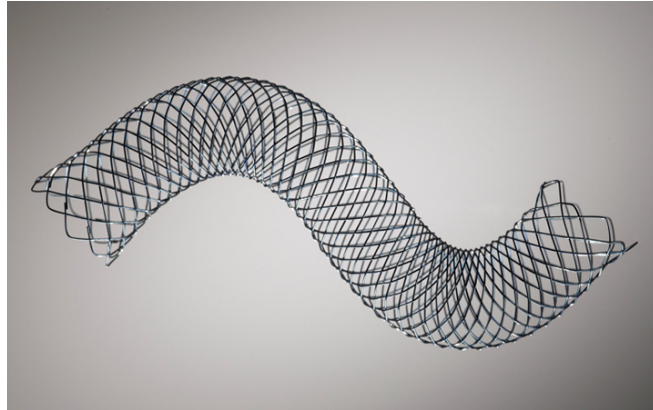


Figura 2. *Stent* coronari metàl·lic (extret on-line via: <https://www.bostonscientific.com/en-US/medical-specialties/gastroenterology/resources/image-library/biliary-metal-stent-images.html>)

La paraula *stent* en medicina és originària de l'odontologia. Prové de Charles Thomas Stent (17 d'Octubre de 1805), un dentista anglès que va desenvolupar un compost dental de plàstic anomenat "massa de Stent", actualment reconegut com l'origen de la paraula *stent* (Deora, 2016).

En el món de la cardiologia, els *stents* coronaris es van desenvolupar a mitjans de la dècada dels vuitanta per superar les limitacions de la angioplàstia coronària, algunes de les quals són les següents:

- La retracció elàstica, tancament de les artèries després d'haver sigut eixamplades pel globus durant l'angioplàstia coronària.
- L'oclusió del vas en fase aguda (Muramatsu et al., 2013).
- El remodelament constrictiu, associat al desenvolupament de reestenosis després d'una angioplàstia (Azzarit et al.).

En la dècada dels noranta, aquesta tecnologia va passar a ser una de les millors estratègies terapèutiques per les persones amb malalties coronàries gràcies a un estudi que va demostrar que els *stents* metàl·lics eren més eficients que l'angioplàstia (Muramatsu et al., 2013).

## *Stents* alliberadors de fàrmacs

Tot i el gran avenç i avantatges que van conferir els *stents* coronaris, encara presentaven dues limitacions importants: la hiperplàsia de neoïntima (proliferació de cèl·lules vasculars) i la reestenosis (disminució de la llum de l'artèria). Es van desenvolupar *stents* alliberadors de fàrmacs per reduir al màxim aquestes limitacions. Els primers assajos amb aquests *stents* van demostrar uns resultats excel·lents en quant a la reducció de la reestenosis en el *stent* (Muramatsu et al., 2013).

A partir del 2006, però, es va veure que els *stents* alliberadors de fàrmacs presentaven un major risc a llarg termini que el dels *stents* metàl·lics convencionals, ja que estaven associats a un retard de l'endotelització causat pels fàrmacs (Jiang et al., 2017), una disfunció endotelial i reaccions d'hipersensibilitat local (Muramatsu et al., 2013).

Va ser llavors quan es van començar a desenvolupar altres tipus de *stents*, com els *stents* biodegradables.

### Stents biodegradables

Els *stents* metàl·lics presenten una vida en sang molt llarga que pot derivar a complicacions com trombosis, hiperplàsia i inflamacions cròniques. Es tracta de *stents* fabricats amb material no biodegradable, els quals s'implanten als vasos sanguinis de forma permanent. Aquests *stents* només poden ser eliminats del cos del pacient per un procés molt invasiu (operació) (Jiang et al., 2017).

Existeix una alternativa a aquests *stents* permanents: els *stents* cardiovasculars bioreabsorbibles o biodegradables (SCB) (Figura 3). Es tracta de *stents* que es degraden al cap d'un temps d'haver estat implantats en el vas sanguini, fet que és molt interessant per la seva utilització en enginyeria biomèdica (Jiang et al., 2017). El temps de degradació depèn del material pel qual està fabricat el *stent*.

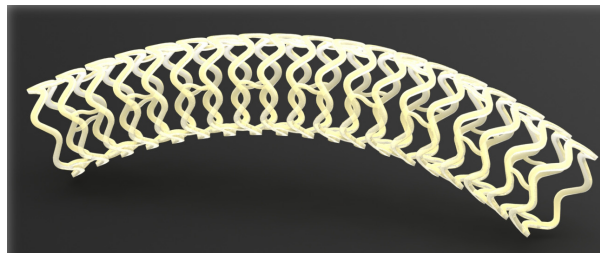


Figura 3. Stent coronari bioreabsorbible (SCB) (extret on-line via: <https://www.dicardiology.com/content/new-bioresorbable-stent-uses-technology-appear-angiographic-x-ray>)

Per tal que un *stent* sigui considerat bioreabsorbible, aquest ha de complir els requeriments següents (Jiang et al., 2017):

- El seus productes de degradació han de tenir la mínima toxicitat pel cos humà.
- La taxa de degradació del biomaterial ha de coincidir amb la taxa de recuperació del teixit vascular. Una degradació massa ràpida podria derivar en la pèrdua prematura del suport radial del *stent*, mentre que una degradació massa lenta podria augmentar el risc de les complicacions induïdes pel material.
- El biomaterial ha d'induir una endotelització suficient ràpida com per restablir les funcions del teixit vascular.

Aquests requeriments minimitzen les complicacions cròniques i alliberen els vasos sanguinis reparats de la restricció produïda per un *stent* permanent (Jiang et al., 2017). S'ha vist, però, que poden veure's influïts pels processos de fabricació dels *stents* (A. J. Guerra & Ciurana, 2018), així com pels processos d'esterilització d'aquests (Grabow et al., 2005), ja que ambdós tenen una dramàtica influència sobre les propietats mecàniques dels materials.

Els dos primers punts han estat molt ben estudiats. S'ha avaluat la seguretat i l'eficàcia dels *stents* de PLLA (àcid Poli-L-làctic) (Tamai et al., 2000); a part s'ha estudiat la degradació d'alguns materials i s'ha vist que és similar a la que es dona en condicions *in vivo* (Shen et al., 2013).

Existeix molt poca bibliografia, però, que parli del tercer requeriment dels SCB. Hi ha molt pocs estudis sobre les propietats d'adhesió de les cèl·lules en *stents* bioreabsorbibles. Tot i així, en els últims anys s'han anat realitzant més estudis. Primerament, s'ha analitzat l'adhesió cel·lular en *stents* recoberts amb poly-L-lisina i fibronectina, observant un augment de l'adhesió cel·lular en aquest tipus de *stent* (Wang et al., 2006). D'altra banda, s'han desenvolupat estratègies per augmentar l'endotelització en els *stents* (Xu et al., 2012), així com també s'ha estudiat la influència de la microestructura de la superfície dels *stents* en l'endotelització i la trombogènesi i s'ha demostrat que els *stents* amb certa estructura cúbica presenten una adhesió cel·lular major en comparació als *stents* de superfície llisa (Lutter, Nothhaft, Rzany, Garlichs, & Cicha, 2015). Finalment, també s'han analitzat diversos polímers biodegradables per controlar la degradació i l'adhesió de les cèl·lules endotelials en *stents* de Mg (Jiang et al., 2017).

Tot i els avenços realitzats en el camp dels SCB, actualment encara hi ha molts desafiaments. És per això que en aquest treball es volen estudiar els efectes de la geometria i el material amb el que es fabriquen els *stents* en l'adhesió cel·lular. S'han cultivat 27 *stents* diferents, fabricats amb dos materials diferents: policaprolactona (PCL) i àcid polilàctic (PLA). El cultiu s'ha realitzat amb una línia cel·lular de **fibroblasts de ratolí** (3T3) obtinguts a l'*American Type Culture Collection* (ATCC®, Rockville, MD, USA).

La policaprolactona (PCL) (Figura 4) és un polièster alifàtic biodegradable molt utilitzat en enginyeria de teixits gràcies a la seva biocompatibilitat, biodegradació, estabilitat estructural i propietats mecàniques (Lee et al., 2006). S'obté a partir de la polimerització de la caprolactona.

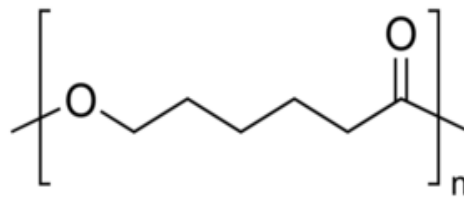


Figura 4. Estructura química de la policaprolactona (PCL) (extret on-line via: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/181609?lang=es&region=ES>)

L'àcid polilàctic (PLA) (Figura 5) és un polièster alifàtic biodegradable derivat de recursos naturals. És un material més bioactiu i amb una hidrofòbia menor que el PCL (Lee et al., 2006).

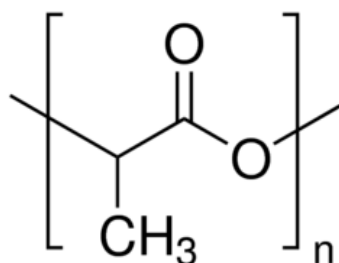


Figura 5. Estructura química de l'àcid polilàctic (PLA) (extret on-line via: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/38534?lang=es&region=ES&gclid=EAlalQobChMIzq6FvNiP2wIVBijVCh0ZCgO0EAAAYASAAEgLSrCPD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/38534?lang=es&region=ES&gclid=EAlalQobChMIzq6FvNiP2wIVBijVCh0ZCgO0EAAAYASAAEgLSrCPD_BwE))

## Processos d'esterilització

Per poder ser cultivats amb cèl·lules, els *stents* (com qualsevol material biomèdic) han de ser esterilitzats. L'esterilització és un procediment obligatori per qualsevol dispositiu mèdic que ha d'entrar en contacte amb qualsevol part del cos humà. Es basa en destruir els microorganismes mitjançant mètodes físics, químics o la combinació d'ambdós. Com que molts microorganismes, en especial les espores bacterianes, presenten altes resistències a l'estrès ambiental, l'esterilització completa només s'aconsegueix amb tractaments molt agressius i condicions ambientals totalment diferents de pel que el material ha estat dissenyat. Això pot produir modificacions en el material que s'està esterilitzant (Tessarolo, 2008).

Segons la bibliografia (Tessarolo, 2008), actualment existeixen diverses tècniques d'esterilització que inclouen mètodes tradicionals (autoclau, òxid d'etilè, radiació gamma, etc.) i mètodes més recents. Tot i la gran varietat de tècniques actuals, no existeix cap procediment que garanteixi l'esterilització completa del material i alhora, no modifiqui les seves propietats inherents. Tots els procediments tenen pros i contres.

En aquest treball, també s'ha estudiat l'efecte de diferents mètodes d'esterilització en els *stents* amb l'objectiu de determinar quin dels mètodes és el més eficient.

## Objectives

The main aim of this study is **knowing the cell behaviour in stents manufactured with biodegradable polymers**. To achieve this main objective, it has been necessary to define some secondary objectives:

1. Study the effects of different sterilization methods on the properties of a 3D-printed polycaprolactone *stents*. The accomplishment of this objective has resulted in an indexed publication.
2. Study the cell proliferation in stents manufactured with biodegradable polymers.
3. Characterize the morphology and the cellular adhesion of the fibroblasts cells (3T3) into the *stents*.

## Metodologia

### 1. Fabricació dels stents

Els stents utilitzats en aquest treball són part d'una tesi doctoral que s'està desenvolupant en el GREP (Grup de Recerca en Enginyeria de Producte, Procés i Producció) de la Universitat de Girona.

Els stents es defineixen per la geometria de la cel·la ( $C_G$ ) (Figura 6), el diàmetre intern ( $I_\phi$ : 4mm), la grossor del stent ( $S_w$ : 0,2mm), el número de cel·les ( $N_C$ ), l'àrea de les cel·les ( $C_A$ ), la llargada total ( $L$ : 4,6mm) i el material (M: PCL-PLA) (Figura 7).

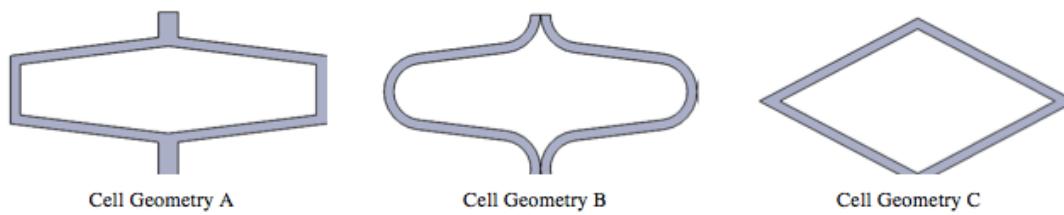


Figura 6. Dibuix de tres geometries de cel·les diferents utilitzades per fabricar els stents. S'han fabricat 9 stents diferents de cada geometria.

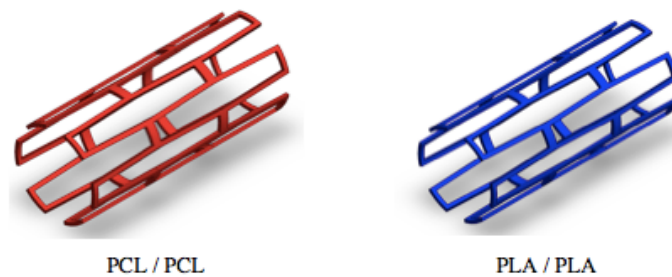


Figura 7. Dibuix de dos stents fabricats amb dos materials diferents: PCL i PLA

Per estudiar els efectes de la geometria i el material en l'adhesió cel·lular, s'han fabricat 27 dissenys de stents diferents (Figura 8) de dos materials diferents, policaprolactona CAPA 6500<sup>®</sup> (PCL, Perstorp) i àcid polilàctic (PLA, RepRap BCN). Els paràmetres que difereixen entre aquests 27 stents han estat la geometria de les cel·les ( $C_G$ ), el nombre de cel·les ( $N_C$ ) i la taxa de flux<sup>1</sup> per PCL ( $F_{R\ PCL}$ ) i per PLA ( $F_{R\ PLA}$ ). La Taula 1 mostra els valors d'aquests paràmetres en les 27 geometries diferents de stents.

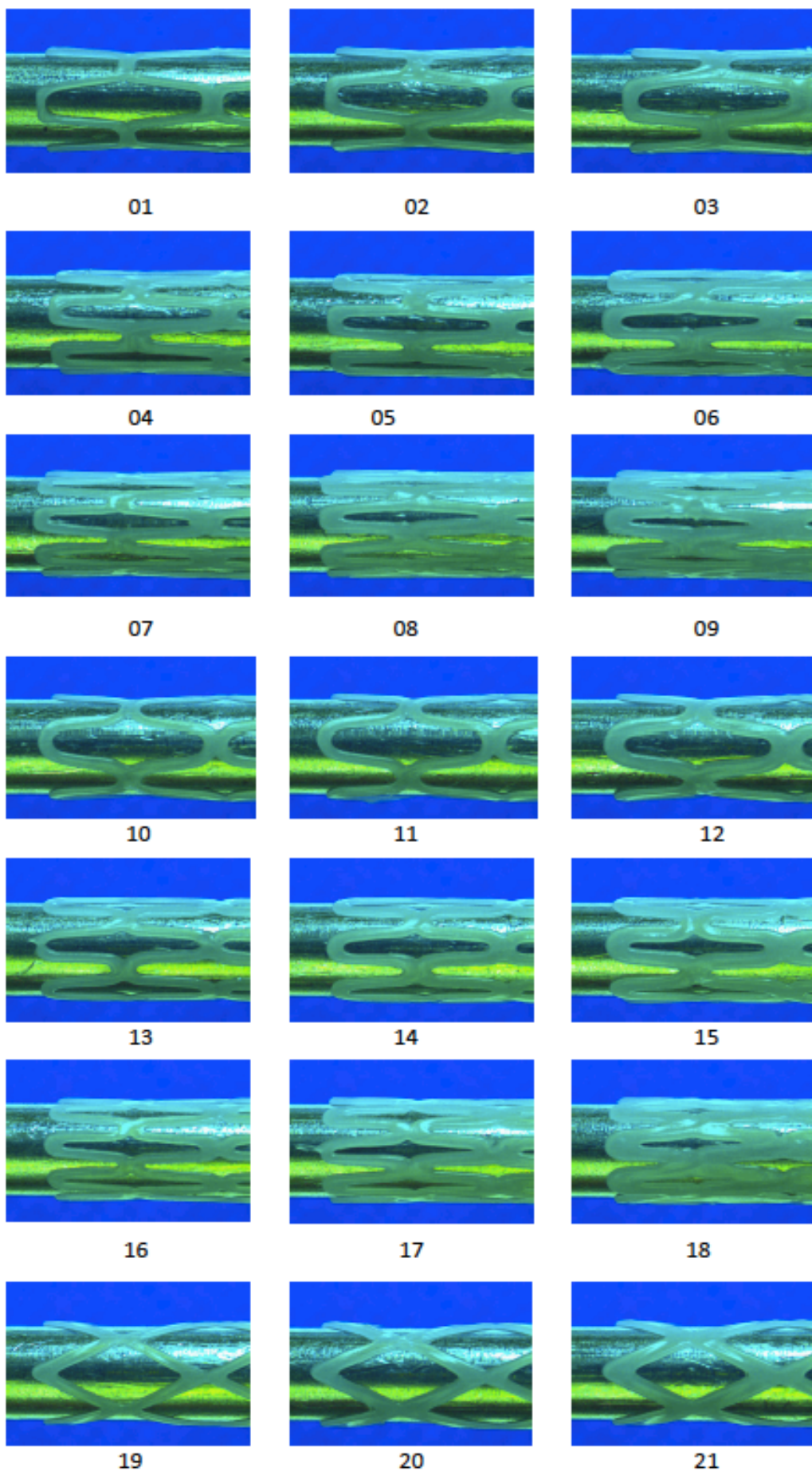
Taula 1. Geometria de les cel·les ( $C_G$ ), nombre de cel·les ( $N_C$ ) i taxa de flux per PCL ( $F_{R\ PCL}$ ) i per PLA ( $F_{R\ PLA}$ ) de les 27 geometries diferents de stents (G). La taxa de flux (FR) es va escollir per obtenir el mateix grossor de stent ( $S_w$ ) per PCL i PLA.

G	$C_G$	$N_C$	$F_{R\ PCL}$	$F_{R\ PLA}$	G	$C_G$	$N_C$	$F_{R\ PCL}$	$F_{R\ PLA}$	G	$C_G$	$N_C$	$F_{R\ PCL}$	$F_{R\ PLA}$
01	A	4	50	60	10	B	4	50	60	19	C	4	50	60
02	A	4	65	85	11	B	4	65	85	20	C	4	65	85
03	A	4	80	100	12	B	4	80	100	21	C	4	80	100
04	A	6	50	60	13	B	6	50	60	22	C	6	50	60
05	A	6	65	85	14	B	6	65	85	23	C	6	65	85
06	A	6	80	100	15	B	6	80	100	24	C	6	80	100
07	A	8	50	60	16	B	8	50	60	25	C	8	50	60
08	A	8	65	85	17	B	8	65	85	26	C	8	65	85
09	A	8	80	100	18	B	8	80	100	27	C	8	80	100

<sup>1</sup> La taxa de flux fa referència al percentatge de material, és a dir de polímer (PCL o PLA), que la impressora expulsa a l'hora de fabricar el stent.

<sup>2</sup> Els mètodes d'esterilització utilitzats en aquest treball tenen com a objectiu l'ús i el cultiu eficient dels stents in





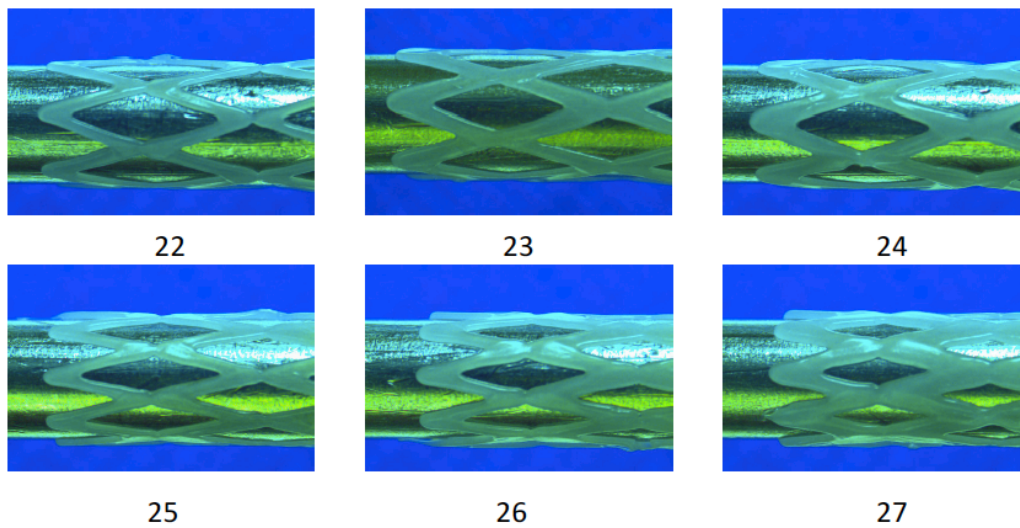
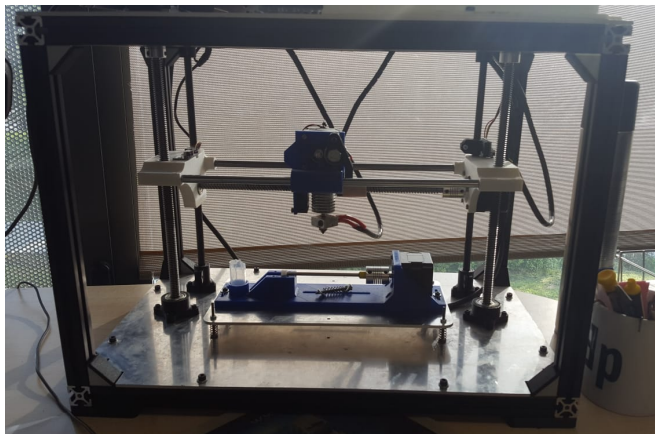
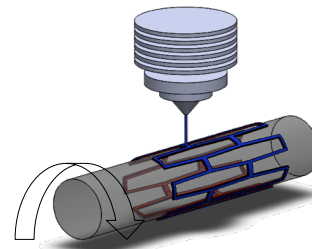


Figura 8. Imatges al microscopi dels 27 stents diferents utilitzats en aquest treball. Les 9 primeres geometries corresponen a la geometria A, de la 10 a la 18 a al geometria B i de la 19 a la 27 a la geometria C. Cada fila correspon al número de cel·les (4, 6 i 8 respectivament). Cada columna correspon a la taxa de flux.

Els stents s'han fabricat mitjançant un procés d'impressió 3D. S'ha utilitzat una impressora tubular 3D dissenyada pel propi grup de recerca del GREP (Figura 9a) (A. Guerra, Roca, & de Ciurana, 2017) que encara es troba en procés de protecció intel·lectual. Es tracta d'una màquina de fabricació additiva 3D basada en la tecnologia *Fused Deposition Modelling (FDM)*; el filament de polímer es fon en la boca de l'extrusor i es diposita en una plataforma rotatòria controlada (Figura 9b).



(a)



(b)

Figura 9. (a) Impressora 3D fabricada pel GREP i utilitzada per la fabricació dels diferents stents. Fotografia pròpia. (b) *Fused Deposition Modelling (FDM)*; metodologia emprada per la impressora.

Segons estudis anteriors (A. J. Guerra & Ciurana, 2018), els stents de policaprolactona (PCL) s'han imprès a 220°C de temperatura, 25°C de temperatura de llit i 300 mm/min de velocitat d'impressió, mentre que els stents de àcid polilàctic (PLA) s'han imprès a 220°C de temperatura, 25°C de temperatura de llit i 200 mm/min de velocitat d'impressió.

## 2. El material

Els materials utilitzats per la fabricació dels *stents* han estat policaprolactona (PCL, Perstorp) i àcid polilàctid (PLA, RepRap, BCN). La [Taula 2](#) mostra les propietats d'aquests dos materials.

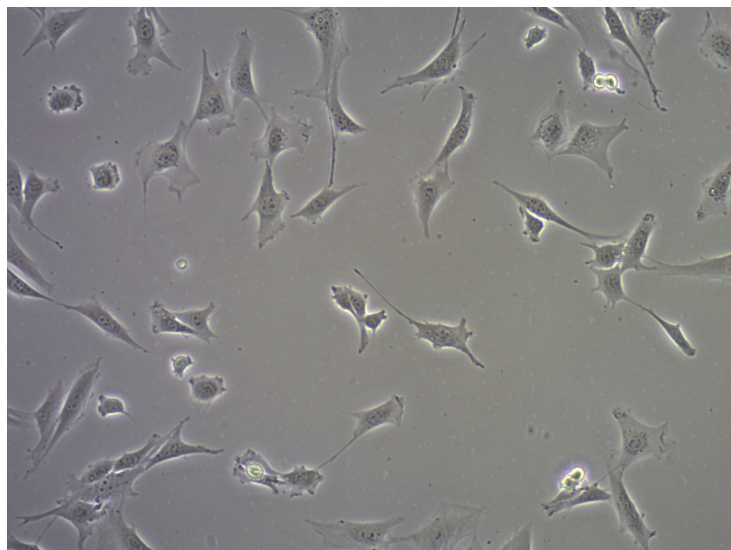
La policaprolactona (PCL) és un polièster biodegradable amb un punt de fusió baix (60°C) i unes lents de transició de -60 °C. En canvi, l'àcid polilàctid (PLA) és un polièster alifàtic termoplàstic biodegradable derivat de recursos naturals com el midó de blat de moro o la canya de sucre. Té un punt de fusió de 173-178°C amb unes lents de transició de 60-65°C. Tant la degradació del PCL com la del PLA es produeix per hidròlisi d'enllaços èster en condicions fisiològiques, de manera que són materials que han rebut molta atenció per ser utilitzats com a biomaterial implantable (Lee et al., 2006).

Taula 2. Propietats dels materials PCL i PLA.

Material	Pes molecular (g/mol)	Temps de degradació (mesos)
PCL	50000	> 24
PLA	90000	≈ 12

## 2. Les línies cel·lulars

Els *stents* han estat cultivats amb fibroblasts de ratolí (NIH/3T3) ([Figura 10](#)), comprats a l'*American Type Culture Collection* (ATCC®, Rockville, MD, USA). Aquests fibroblasts s'han cultivat en medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco, Waltham, MA, USA) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, un 1% de L-glutamina, un 1% de sodi piruvat, 50 µg/mL de penicil·lina i 50µg/mL de estreptomicina (HyClone, Logan, UT, USA). Els 3T3 s'han mantingut en un incubador a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>.



[Figura 10](#). Imatge de fibroblasts de ratolí (3T3) realitzada amb un microscopi òptic confocal (fotografia pròpia) a 40 augments.

Malgrat no ser l'objectiu d'aquest treball, un cop obtinguts els resultats del cultiu amb fibroblasts, s'ha preparat una segona línia cel·lular per complementar aquests resultats, amb la qual es vol iniciar a mode d'exploració la resposta d'una altra línia cel·lular més propera al teixit vascular.

La segona línia cel·lular utilitzada han estat cèl·lules endotelials del cordó umbilical (HUVEC) (Figura 11), comprades a l'*American Type Culture Collection* (ATCC®, CRL1730). Les cèl·lules endotelials s'han cultivat en medi *Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium* (F-12K; ATCC), també comprat a l'ATCC i suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (ATCC), un 1% d'heparina, suplement específic pel creixement de cèl·lules endotelials (ECGS; Sigma Aldrich Co. LLC., St Louis, MO, USA), 50 µg/mL de penicil·lina i 50µg d'estreptomicina (HyClone, Logan, UT, USA). Les HUVEC s'han mantingut a un incubador a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> fins que es va observar un 90-95% de confluència.

Tot i així, l'estudi amb aquesta línia cel·lular només s'ha iniciat i els resultats obtinguts es consideren "resultats preliminars". S'ha de continuar treballant amb les HUVEC.

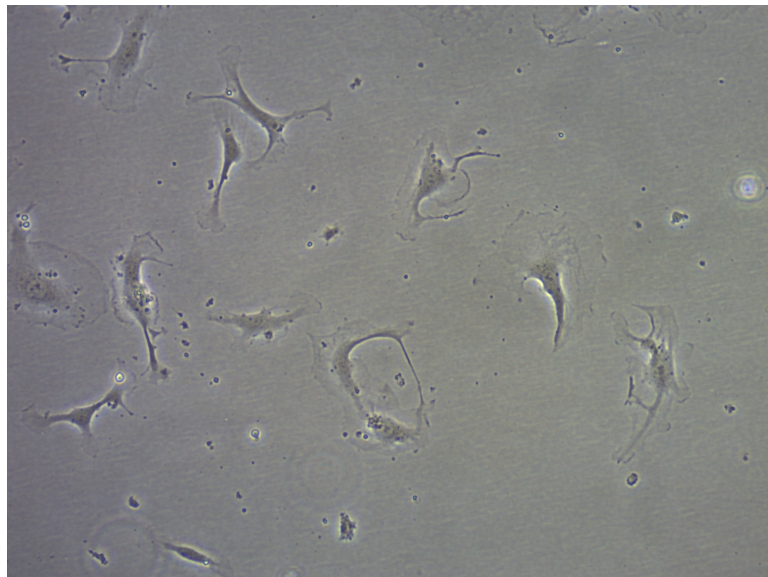


Figura 11. Imatge de cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC) realitzada amb un microscopi òptic confocal (fotografia pròpia) a 40 augments.

### 3. Esterilització dels stents

En aquest estudi s'ha volgut estudiar quins mètodes d'esterilització són els més adients per cultivar els stents *in vitro*<sup>2</sup>. S'han realitzat 3 tractaments; etanol 70%, llum ultraviolada i antibiòtics, cadascun a diferents temps d'exposició al tractament: 0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, i 16h.

#### 3.1. Anàlisi previ a l'esterilització

Prèviament a aplicar aquests mètodes d'esterilització, els stents s'han cultivat durant 24h a l'incubador de 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> en medi *Dulbeccos' Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco, Waltham, MA, USA) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, L-glutamina i un 1% de sodi piruvat, però sense penicil·lina ni estreptomicina (antibiòtics) per assegurar la infecció dels stents. Els stents, doncs, s'han infectat cultivant-los en condicions **no estèrils**

<sup>2</sup> Els mètodes d'esterilització utilitzats en aquest treball tenen com a objectiu l'ús i el cultiu eficient dels stents *in vitro*, però no asseguren l'esterilitat en models *in vivo*.

amb l'objectiu d'observar clarament i sense errors quin mètode d'esterilització és el més adient.

Passades 24h, el canvi del color vermell específic del medi DMEM a groc i l'augment de la opacitat o turbulència d'aquest, indica infecció (Figura 12). A més, s'ha mesurat el pH del medi amb un indicador de pH i s'ha vist que ha disminuït a causa de l'activitat metabòlica dels microorganismes que han contaminat les mostres (*stents*) i els productes àcids.



Figura 12. (a) Mostres de *stents* en medi DMEM a 0h. El medi es troba en el seu color original, vermell. (b) Mostres de *stents* en medi DMEM passades 24h. El medi ha virat a color groc.

### 3.2. Tractament amb etanol

S'han col·locat 18 *stents* contaminats en una placa de Petri de 100mm de diàmetre (Sartstedt, Nümbrecht, Germany), on s'hi ha afegit 10mL d'etanol 70% (diluït amb aigua destil·lada) (PanReac AppliChem, Gatersleben, Germany). S'ha posat la placa en un agitador orbital a 100rpm durant els diferents temps d'exposició (0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, i 16h).

A cada temps d'exposició, s'han tret 3 *stents* (rèpliques), als quals se'ls ha aplicat 2-3 rentats amb *Phosphate Buffered Solution* (PBS; Gibco, Waltham, MA, USA), i s'han col·locat en una placa de 96 pous (Figura 13).

### 3.3. Tractament amb llum ultraviolada

S'han col·locat 18 *stents* contaminats en una placa de Petri de 100mm de diàmetre (Sartstedt, Nümbrecht, Germany) de tal manera que quedin posicionats verticalment per assegurar que la llum ultraviolada (UVA) contacta amb tota la superfície dels *stents*. S'irradien durant els diferents temps d'exposició (0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, i 16h) amb una làmpada de llum UVA de 30W i 254nm de longitud d'ona (Philips, Amsterdam, Netherlands), situada a 50cm de distància dels *stents*.

A cada temps d'exposició s'han tret 3 *stents* (rèpliques) i s'han col·locat en una placa de 96 pous (Figura 13).

### 3.4. Tractament amb antibiòtics

S'han col·locat 18 *stents* contaminats en una placa de Petri de 100mm de diàmetre (Sartstedt, Nümbrecht, Germany), on s'hi ha afegit 10mL de solució antibiòtica antimicòtica al 1% (50 U/mL de penicilina/estreptomicina) (HyClone, Logan, UT, USA). S'ha posat la placa en un agitador orbital a 100rpm durant els diferents temps d'exposició (0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, i 16h).

A cada temps d'exposició s'han tret 3 *stents* (rèpliques), als quals se'ls ha aplicat 2-3 rentats amb *Phosphate Buffered Solution* (PBS; Gibco, Waltham, MA, USA), i s'han col·locat en una placa de 96 pous (Figura 13).

### 3.5. Controls

S'han realitzat dos tipus de controls, un control positiu que consisteix en un *stent* no estèril, i un control negatiu que consisteix en medi estèril sense *stent*.

Un cop posicionats tots els *stents* esterilitzats amb diferents tractaments a diferents temps, s'ha posat medi DMEM suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, L-glutamina i un 1% de sodi piruvat, però sense penicil·lina ni estreptomycina (antibiòtics) (Figura 13), i s'han testat els signes d'infecció a les 24h, 48h, 72h i 144h, observant en quins pous el medi havia virat a groc.

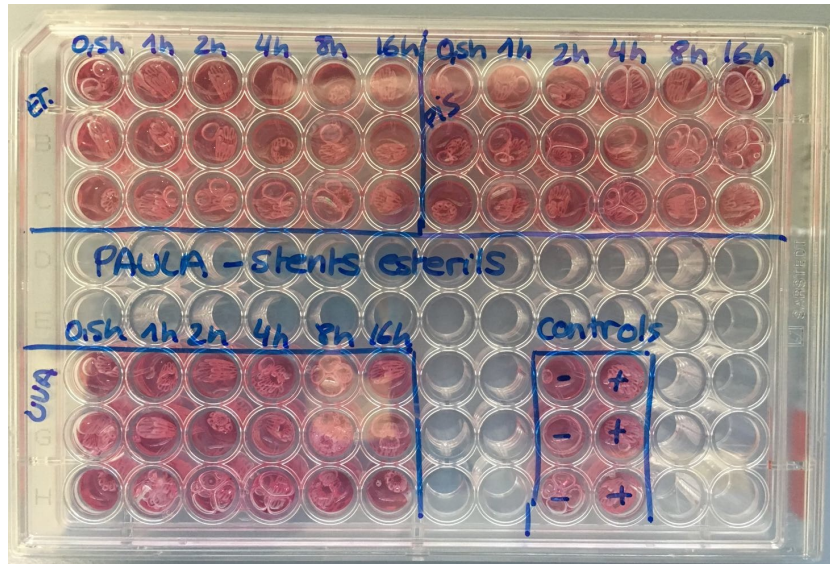


Figura 12. Disseny experimental. *Stents* amb medi DMEM esterilitzats amb diferents tractaments durant diferents temps d'exposició al tractament (fotografia pròpia).

### 4. Proves de densitat cel·lular

Per tal de determinar el número de cèl·lules òptim a sembrar en els *stents*, s'han realitzat diverses proves de densitat cel·lular en les que s'han cultivat fibroblasts (3T3) i cèl·lules endotelials (HUVEC) en plaques adherents.

La metodologia seguida en aquestes proves ha estat: tripsinitzar les cèl·lules, recomptar-les amb l'ajuda d'una cambra de Neubauer, fer els càlculs adients per determinar quin volum de la suspensió cel·lular es sembra a cada pou i sembrar. S'han cultivat 6 quantitats cel·lulars diferents durant 3 dies: 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000 i 70.000 (Figura 14).

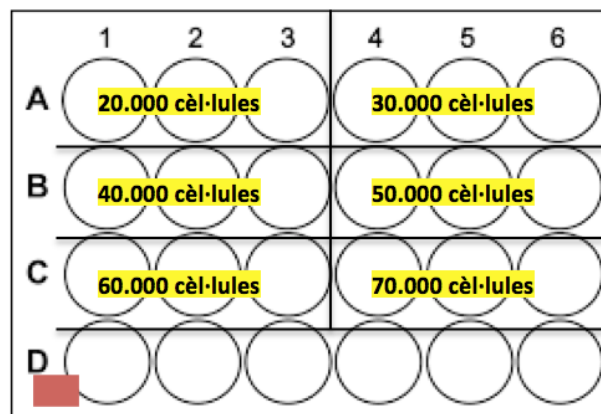


Figura 13. Disseny experimental de les proves de densitat cel·lular.

### 5. Cultiu cel·lular en stents

Els stents s'han esterilitzat amb 1mL d'etanol diluït al 70% amb aigua destil·lada, s'han rentat dues vegades amb PBS (Gibco, Waltham, MA, USA) i finalment, han estat exposats a llum ultraviolada durant 20 minuts.

Els stents estèrils s'han col·locat en 5 plaques no adherents de 24 pous (Sartstedt, Nümbrecht, Germany). A cada pou s'hi ha posat un stent i a més, s'han fet rèpliques internes de cada geometria (s'han sembrat 2 stents de cada geometria). També s'han sembrat cèl·lules en una placa adherent de 24 pous per obtenir un control 2D (Figura 15). El disseny experimental indicat en la Figura 15 s'ha realitzat 3 vegades per obtenir 3 rèpliques.

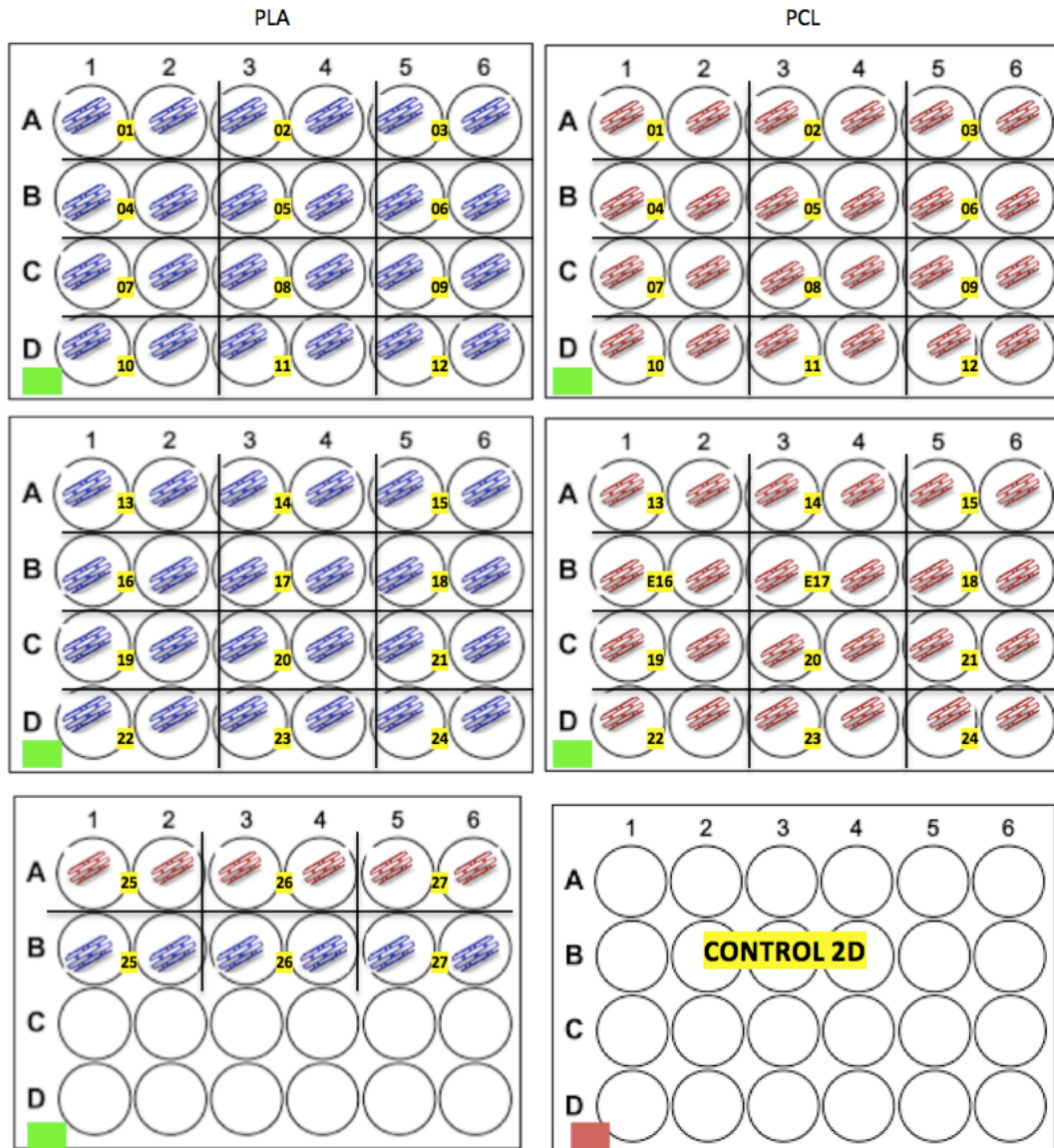


Figura 14. Disseny experimental del cultiu cel·lular en stents.

- Plaques no adherents (3D)
- Plaques adherents (2D)

Cada *stent* ha estat sembrat amb 20.000 fibroblasts (3T3). En el cas de les HUVEC, s'ha sembrat una porció de *stents* amb 40.000 cèl·lules. Les dues línies cel·lulars s'han cultivat durant 3 dies, a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>.

La metodologia seguida per sembrar els *stents* ha estat un tractament amb tripsina per trencar les unions cel·lulars i aixecar les cèl·lules de la placa on es trobaven en manteniment, seguit d'un recompte cel·lular amb una placa de Neubauer per determinar quin volum s'havia de sembrar a cada *stent*. Cada *stent* s'ha sembrat amb 1mL de medi DMEM en el cas de les 3T3 i 1mL de medi F-12K en el cas de les HUVEC, més el volum de suspensió cel·lular necessari per tenir 20.000 cèl·lules (en el cas de les 3T3) o 40.000 cèl·lules (en el cas de les HUVEC).

Passats els 3 dies de cultiu, s'ha realitzat un assaig MTT (bromur de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolum) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) per determinar la proliferació cel·lular a cada geometria. S'aspira el medi vell, es mouen els *stents* a una placa nova per assegurar que només aquelles cèl·lules que han crescut adherides als *stents* es quantifiquen, i es posa medi nou amb un 10% del reactiu MTT als *stents* (900µl de medi i 100µl de MTT). L'MTT és una sal que els mitocondris de les cèl·lules viables redueixen a formazan formant uns cristalls lilosos que es dilueixen amb dimetilsulfòxid (DMSO).

Els *stents* es deixen en cultiu amb medi + MTT durant 2h i 30min en el cas dels 3T3, temps que triguen les cèl·lules en reduir l'MTT, i 4h en el cas de les HUVEC, ja que es va veure que amb 2h i 30min les HUVEC no havien reduït quasi MTT.

Passat aquest temps, s'aspira el medi + MTT i es posa 1mL de dimetilsulfòxid (DMSO) a cada *stent*, que es deixa actuar durant 1-2h. Es pipetegen 3 vegades 100µl de cada mostra en una placa de 96 pous, de la que llegeix l'absorbància a 570nm amb un lector de microplaques (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'absorbància de la solució DMSO i els cristalls diluïts està relacionada amb el nombre de cèl·lules. Es considera, doncs, que quants més cristalls de formazan formats, més cèl·lules hi havia a la mostra.

El control 2D s'ha processat de la mateixa manera que els *stents*.

## 6. Proves amb microscòpia de fluorescència confocal

Per tal de visualitzar microscòpicament la morfologia de les cèl·lules adherides als *stents*, així com comparar-la amb la morfologia de les cèl·lules cultivades bidimensionalment, s'ha processat a la seva observació per microscòpia fluorescent.

Primer, s'han tallat les cel·les del *stent* 18, ja que és el que presenta una major adhesió cel·lular (veure **3. Cultiu cel·lular dels stents** de l'apartat de **Resultats**). Les cel·les tallades s'han cultivat en una placa de 24 pous (Sartstedt, Nümbrecht, Germany) amb 20.000 fibroblasts (3T3) i medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco, Waltham, MA, USA) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, un 1% de L-glutamina, un 1% de sodi piruvat, 50 µg/mL de penicil·lina i 50µg/mL de estreptomina (HyClone, Logan, UT, USA), seguint el mateix protocol de cultiu que en l'apartat **5. Cultiu cel·lular en stents**. Les cel·les cultivades es mantenen en un incubador a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> durant 3 dies.

Passats els 3 dies de cultiu, es s'ha procedit a tenyir les cel·les. El **protocol de tinció** ha estat el següent: 2 rentats amb *Phosphate Buffered Solution* (PBS; Gibco, Waltham, MA, USA) de 5 minuts cadascun; fixar la mostra amb 4% de paraformaldehid durant 20 minuts a temperatura ambient; 1 rentat amb PBS i es permeabilitzen les cèl·lules amb 0,2% de Triton X-100 durant 10 minuts. Per evitar unions no específiques, s'ha afegit Blocking Buffer durant 20 minuts a temperatura ambient. Seguidament, s'ha tenyit l'actina del citoesquelet amb



**Rodamina-faloidina** (1:200) en Blocking Buffer durant 15 minuts. Finalment, s'ha tenyit el nucli amb **DAPI** (1:1000) en Blocking Buffer durant 7 minuts.

La mostra tenyida i un cultiu en dues dimensions s'han portat a la Unitat de Biotecnologia i Biomedicina dels **Serveis Tècnics de la Universitat de Girona** (STR), on tenen un Microscopi Làser Confocal espectral i de llum estructurada, model NIKON A1R i resolució 150 nm en XY i 250 nm en Z (any d'adquisició: 2013) (Figura 16).



Figura 15. Microscopi Làser confocal utilitzat per observar fibroblasts (3T3) adherits a la cel·la d'un *stent*. Es troba a la Unitat de Biotecnologia i Biomedicina dels Serveis Tècnics de la Universitat de Girona (fotografia pròpia).

La microscòpia làser confocal és una tècnica d'observació microscòpica que es fonamenta en obtenir imatges de l'emissió de llum fluorescent per part de la mostra. Presenta grans avantatges sobre la microscòpia convencional: més contrast, més nitidesa i resolució de les imatges, possibilitat d'aconseguir seccions òptiques de les imatges i de la mostra per realitzar estudis tridimensionals, possibilitat de dur a terme diferents assajos de fluorescència en cèl·lules vives, possibilitat d'observar l'estructura dels materials, etc. (Serveis de la Universitat de Girona).

## 7. Ètica i sostenibilitat

Els *stents* utilitzats en aquest treball han estat fabricats amb polímers biodegradables (PCL i PLA) que no generen material tòxic. A més, la impressora 3D amb la que s'han imprès pot ser utilitzada per fabricar les seves pròpies peces i així, evitar comprar-ne de noves en cas que alguna es trenqui.

Tots els residus generats durant el cultiu cel·lular (pipetes, plaques, guants, etc.) han estat llançats en cubells específics per material biològic. Les plaques en les que s'ha realitzat el cultiu cel·lular han estat reciclades el màxim possible, sempre i quan no hi hagués risc de contaminació ni es perjudicés el creixement de les cèl·lules.

## Resultats

### 1. Proves d'esterilització dels stents

La Figura 17 mostra els resultats de les proves d'esterilització amb 3 tractaments diferents: etanol 70% (ET.), penicil·lina/estreptomycina (PIS) i llum ultraviolada (UVA). També s'indiquen els resultats dels controls positiu (+) i negatiu (-).

Tant el tractament amb etanol com el tractament amb llum ultraviolada indiquen que el medi ha mantingut el seu color original, mentre que en el tractament amb antibiòtics (penicil·lina/estreptomycina) el medi ha virat de color vermell a color groc.

En el control negatiu (-) el medi ha mantingut el seu color vermell i en el control positiu (+) el medi ha virat completament a color groc.

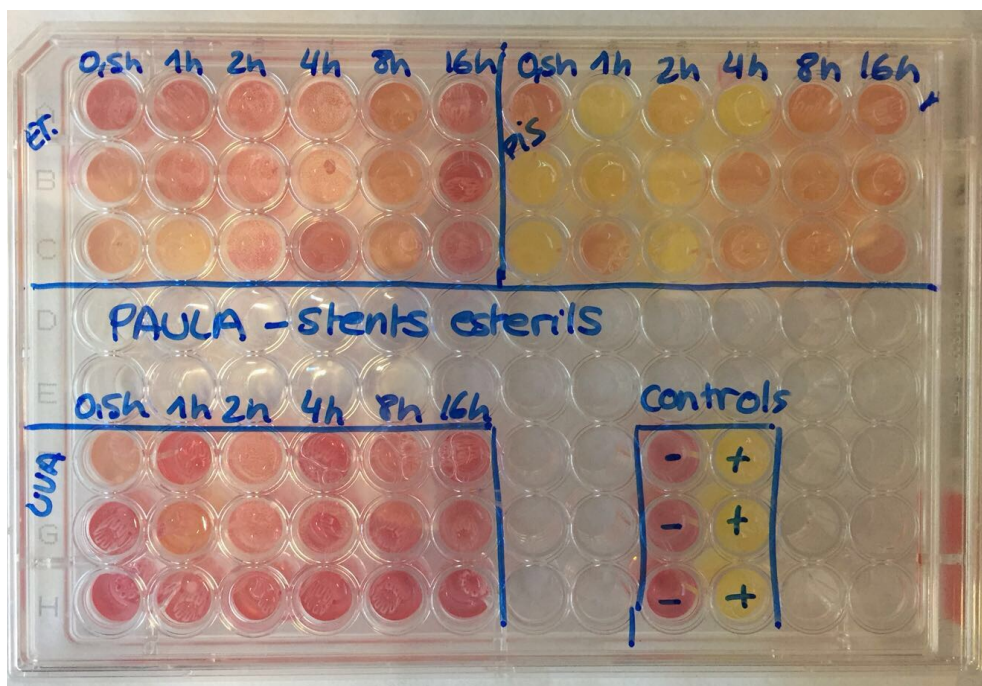


Figura 16. Resultats de les proves d'esterilitat. ET = etanol 70%; PIS = penicil·lina/estreptomycina; UVA = llum ultraviolada; Control - = medi sense stent; Control + = medi amb stent sense esterilitzar (fotografia pròpia).

## 2. Proves de densitat cel·lular

La Figura 18 indica que quan major és el nombre de cèl·lules sembrades, major és l'absorbància obtinguda. En aquest estudi s'han sembrat 20000 cèl·lules en el cas dels fibroblasts (3T3) i 40000 cèl·lules en el cas de les cèl·lules endotelials (HUVEC) per evitar una absorbància massa alta en el control 2D.

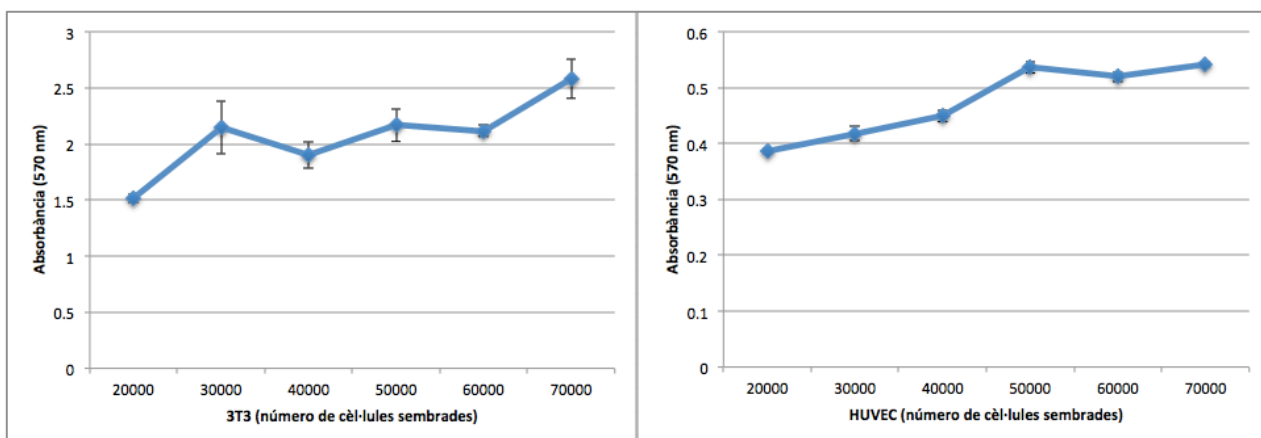


Figura 18. Gràfics resultants de les proves de densitat cel·lular.

### 3. Cultiu cel·lular dels stents

La Figura 19 indica els resultats del cultiu dels stents amb fibroblasts de ratolí (3T3). Cada barra correspon a la mitjana del percentatge de proliferació cel·lular obtingut a cadascuna de les 3 rèpliques, per cada geometria i material.

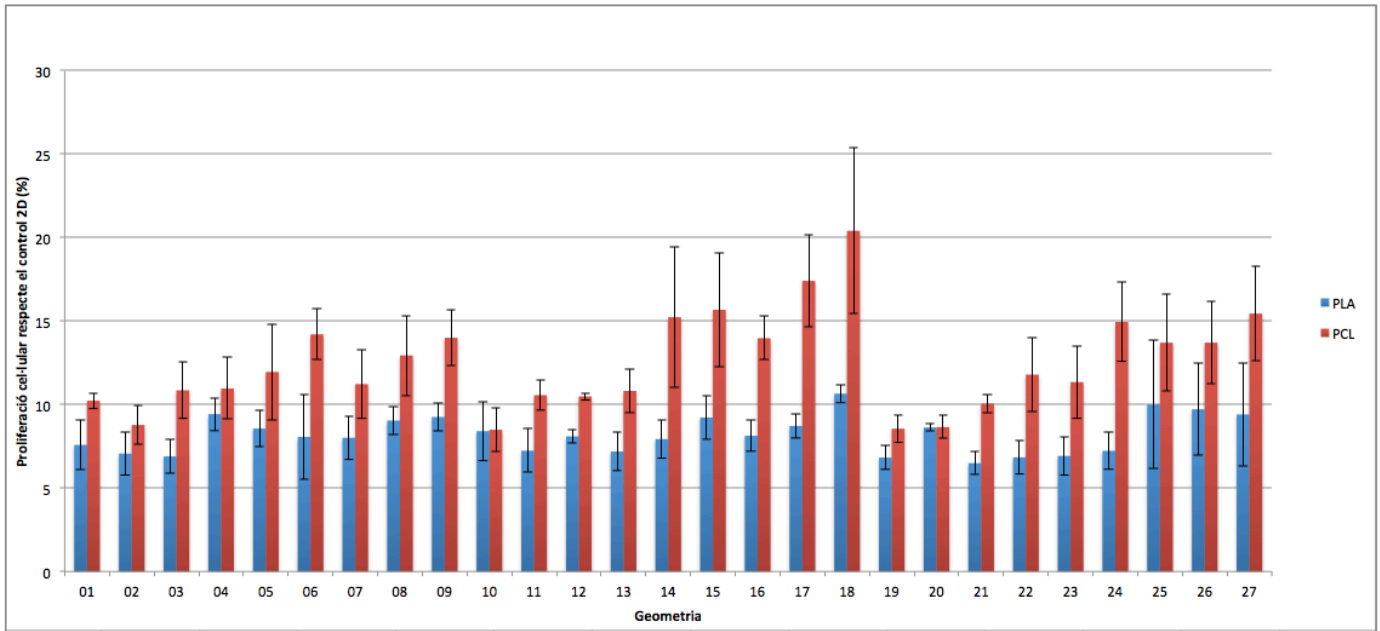


Figura 17. Resultats finals del cultiu dels stents amb fibroblasts de ratolí (3T3). Els valors estan calculats en funció de l'absorbància obtinguda en el control 2D. Cada barra és la mitjana del % de proliferació cel·lular respecte el control 2D obtingut en cadascuna de les 3 rèpliques realitzades.

Els resultats del cultiu de fibroblasts de ratolí (3T3) (Figura 19) indiquen una proliferació cel·lular en stents d'entre un 10% i un 20% respecte el control 2D, així com respostes diferents en PCL i PLA. En general, els stents de PCL mostren més proliferació cel·lular que els stents de PLA, deixant de banda la geometria dels stents.

La Figura 20 mostra els resultats de l'Anàlisi de Regressió realitzada amb el programa Quantum XL, en el qual s'analitzen els resultats del cultiu de fibroblasts de ratolí en funció d'uns paràmetres d'entrada: la geometria de les cel·les (a), la taxa de flux (b), el nombre de cel·les (c) i el material (d).

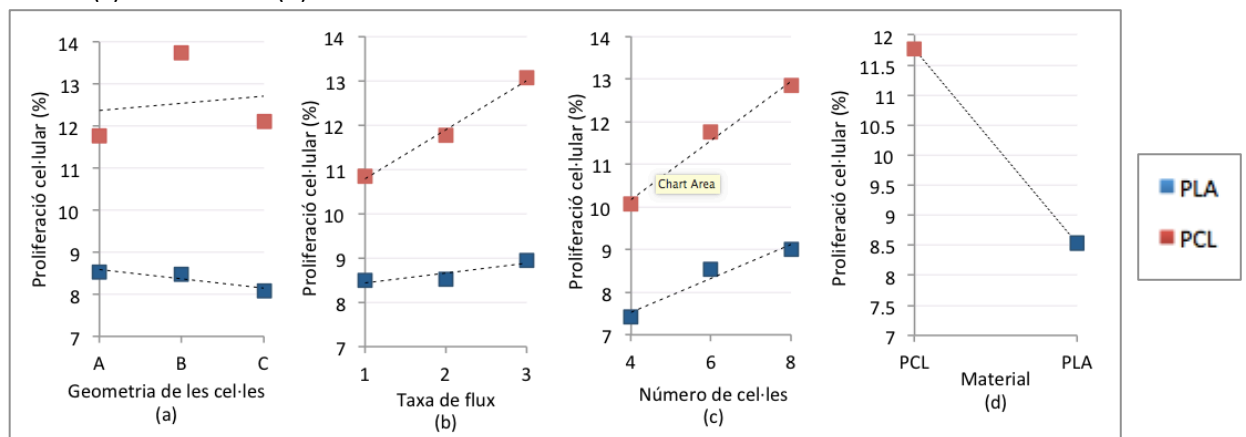


Figura 18. Resultats del programa estadístic Quantum XL. (a) Efecte de la geometria de les cel·les en la proliferació cel·lular ( $p > 0.05$ ). (b) Efecte de la taxa de flux en la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ). (c) Efecte del nombre de cel·les en la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ). (d) Efecte del material en la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ).

L'Anàlisi de Regressió (Figura 20) indica una forta influència de la taxa de flux, el nombre de cel·les i el material ( $p < 0.05$ ) sobre la proliferació cel·lular. La geometria de les cel·les dels *stents* no tenen una influència estadísticament significativa sobre la proliferació cel·lular (Figura 20a).

La Figura 21 indica els resultats del cultiu dels *stents* amb cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC). En aquest cas, cada barra correspon al percentatge de proliferació cel·lular obtingut en la primera rèplica realitzada amb les HUVEC, per cada geometria i material. Es tracta de resultats preliminars d'un futur estudi.

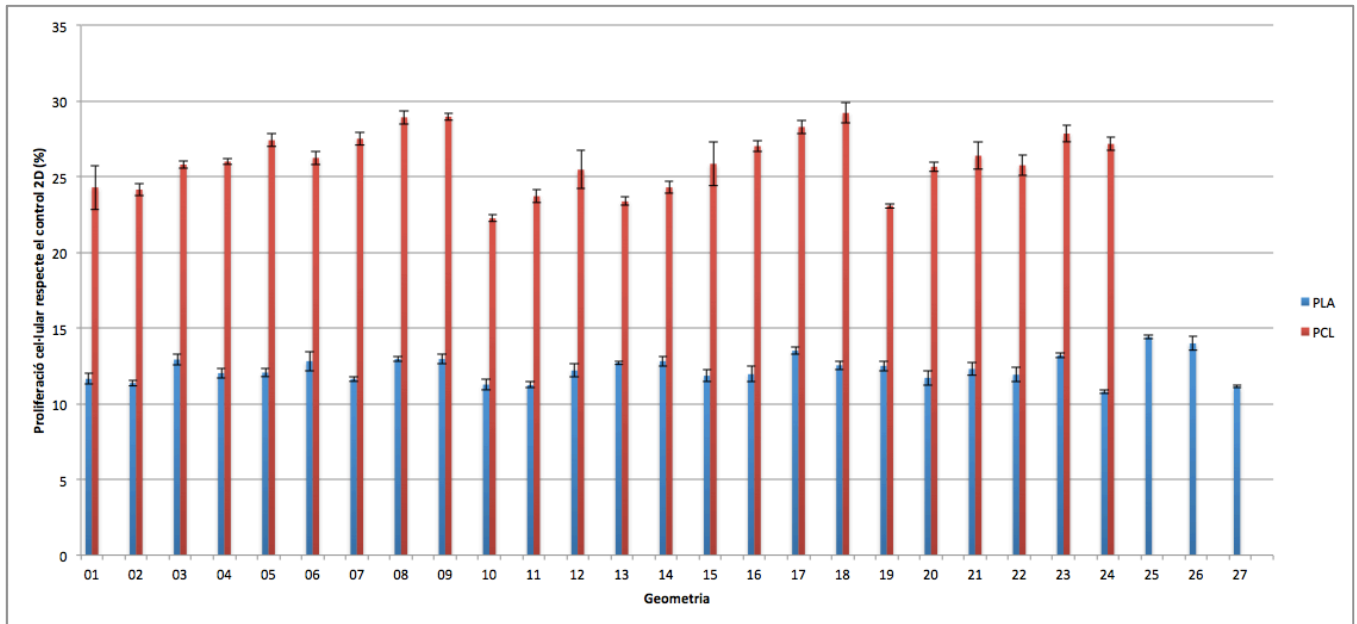
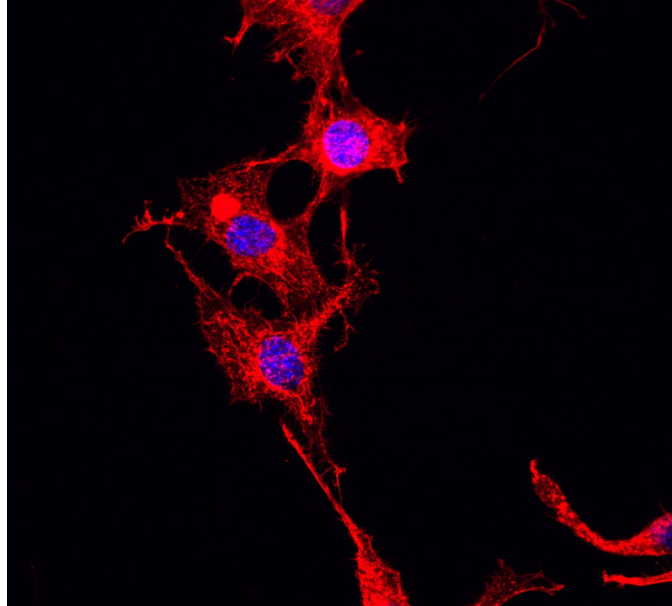


Figura 19. Resultats finals del cultiu dels *stents* amb cèl·lules endotelials (HUVEC). Els valors estan calculats en funció de l'absorbància obtinguda en el control 2D.

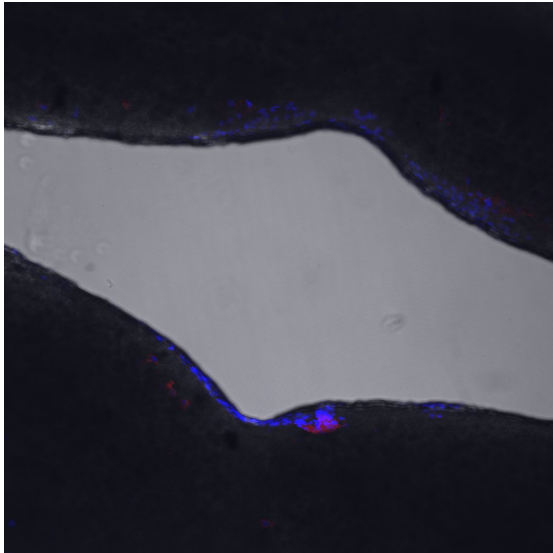
Els primers resultats del cultiu de cèl·lules endotelials (HUVEC) (Figura 21) indiquen diferències majors entre PCL i PLA. Aproximadament, s'observa una proliferació cel·lular en *stents* de PLA d'un 10% i en *stents* de PCL d'un 25% respecte el control 2D. Altre vegada, els *stents* de PCL mostren més proliferació cel·lular que els *stents* de PLA, deixant de banda la geometria dels *stents*.

#### 4. Fotografies obtingudes per microscòpia làser confocal

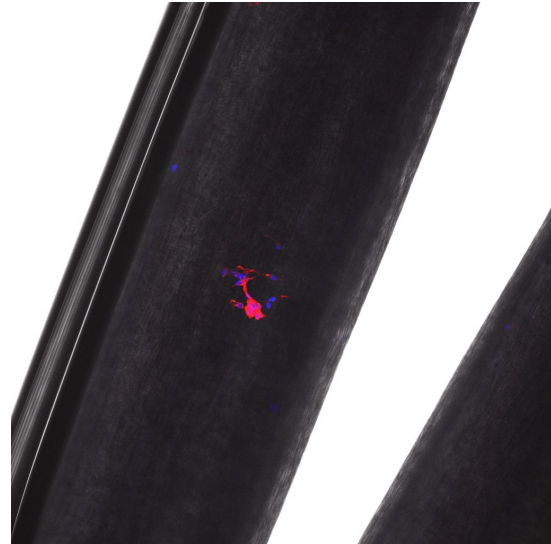
La Figura 22 mostra imatges del cultiu de fibroblasts obtingudes amb el Microscopi Làser Confocal dels Serveix Tècnics de la Universitat de Girona (STR). En vermell s'observa el citoplasma de les cèl·lules, tenyit amb Rodamina-Faloidina i en blau el nucli de les cèl·lules, tenyit amb DAPI (veure 6. Proves amb microscòpia de fluorescència confocal de l'apartat de Metodologia).



(a)



(b)



(c)

Figura 22. Fotografies realitzades amb el Microscopi Làser Confocal dels Serveix Tècnics de la Universitat de Girona. **(a)** Fibroblasts (3T3) cultivats en plaques adherents (2D). **(b)** Fibroblasts (3T3) cultivats en una cel·la de PCL. Els punts blaus al voltant de la cel·la indiquen els nuclis de les cèl·lules adherides al *stent*. **(c)** Fibroblasts (3T3) cultivats en una cel·la de PLA. La taca vermella indica el citoplasma de les cèl·lules adherides al *stent*.

## Discussió

Considerant la proliferació dels fibroblasts (3T3) en el control 2D com una proliferació del 100%, s'ha obtingut un 10%-20% de proliferació cel·lular en *stents* respecte aquest control 2D, aproximadament (Figura 19). Aquesta disminució del percentatge és conseqüència de la disminució de la superfície disponible pel creixement de les cèl·lules.

Pel control 2D, les cèl·lules es cultiven en plaques de 24 pous. Cada pou té una àrea de cultiu de 200 mm<sup>2</sup>, mentre que els *stents* presenten les superfícies indicades en la Taula 3.

Taula 3. Superfícies dels *stents*<sup>3</sup>

Geometria	Superfície del <i>stent</i> (mm <sup>2</sup> )	Geometria	Superfície del <i>stent</i> (mm <sup>2</sup> )	Geometria	Superfície del <i>stent</i> (mm <sup>2</sup> )
01	38,256	10	38,256	19	38,256
02	48,216	11	48,216	20	48,216
03	53,376	12	53,376	21	53,376
04	57,576	13	57,576	22	57,576
05	62,436	14	62,436	23	62,436
06	71,436	15	71,436	24	71,436
07	71,856	16	71,856	25	71,856
08	76,656	17	76,656	26	76,656
09	91,776	18	91,776	27	91,776

En el control 2D les cèl·lules tenen una superfície de cultiu major per proliferar i expandir-se, però els *stents* són malles poroses, de manera que al cultivar-hi fibroblasts aquests tenen una superfície de cultiu menor i com a conseqüència, obtenim un percentatge de proliferació cel·lular menor.

La superfície que tenen les cèl·lules per proliferar està directament relacionada amb aquesta proliferació. Com és d'esperar, la proliferació de les cèl·lules serà major quant major sigui la superfície que tenen per créixer. S'espera que amb una superfície menor, com és el cas dels *stents*, el percentatge de proliferació cel·lular respecte el control 2D sigui menor.

Cal destacar que els resultats no indiquen que les cèl·lules proliferin menys, sinó que en comparació al control 2D els valors d'absorbància, i per tant de fibroblasts (3T3) en els *stents*, són menors. Aquest fet es demostra amb l'observació microscòpica d'una cel·la d'un *stent* cultivada amb fibroblasts (3T3), en la qual s'observen clarament les cèl·lules adherides (Figura 22b, Figura 22c).

Com s'ha comentat abans, els *stents* són malles poroses. Aquests porus, també anomenats cel·les, poden tenir diferent diàmetre en funció de si un *stent* està format per més o menys porus. La mida dels *stents* és la mateixa independentment de la seva forma o geometria, de manera que un *stent* format per 4 cel·les tindrà unes cel·les més grosses que un *stent* format per 6 o 8 cel·les. El número de cel·les i la mida d'aquestes cel·les tenen una relació inversament proporcional.

<sup>3</sup> Aquestes dades són teòriques. Corresponen a la superfície del disseny del *stent* a l'ordinador. Les superfícies reals tenen un error del 5% o 10% aproximadament.

El **número de cel·les** que conformen un *stent* està directament relacionat amb la proliferació cel·lular. Si ens fixem en la [Figura 19](#), la proliferació cel·lular augmenta de 3 en 3. En les geometries 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 i 27, els valors són més alts que en les dues geometries anteriors. Això indica que els *stents* formats per 8 cel·les tenen més cèl·lules adherides que els *stents* formats per 4 o 6 cel·les. A mesura que augmenta el número de cel·les que conformen un *stent*, augmenta la quantitat de material i, per tant, la superfície disponible per l'adhesió de les cèl·lules.

La **mida de les cel·les** d'un *stent*, en canvi, està inversament relacionada amb la proliferació cel·lular. Quan més petites siguin aquestes cel·les, menys porus i més material tindrà el *stent*, incrementant així la proliferació cel·lular. La mida de les cel·les es considera un paràmetre molt important, que afecta les propietats i les funcions dels *stents*, ja que directament relacionat amb la migració de les cèl·lules i la vascularització (Lee et al., 2006).

Així com el número de cel·les i com a conseqüència, la mida d'aquestes presenten una relació significativa amb la proliferació cel·lular, la **geometria** de les cel·les dels *stents* no té cap influència estadísticament significativa sobre la proliferació cel·lular ([Figura 20a](#)). De totes maneres, observant les diferències entre geometries de la [Figura 19](#), s'ha hipotetitzat que les geometries amb un major nombre de cantonades podrien afavorir l'adhesió cel·lular. Alguns autors (McClean, Eiger, & Egler, 2001) han demostrat que la geometria dels *stents* pot afectar la proliferació de la neointima i que sembla tenir una gran influència en les taxes de trombosis i reestenosis.

L'Anàlisi de Regressió també indica una forta influència de la taxa de flux sobre la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ) ([Figura 20b](#)). La **taxa de flux** fa referència a la quantitat de material (PCL-PLA) que expulsa la impressora a l'hora de fabricar un *stent*. Quan major és la taxa de flux, més material expulsa la impressora i com a conseqüència, més material conforma el *stent*. *Stents* amb taxes de flux altes presenten més proliferació cel·lular que *stents* amb taxes de flux baixes.

En quant al **material**, també influeix fortament sobre la proliferació cel·lular ( $p < 0.05$ ) ([Figura 20d](#)). El percentatge de proliferació cel·lular és major en els *stents* fabricats amb PCL que amb PLA. El PCL té un punt de fusió menor que el de PLA, de manera que es considera un material més tou, ja que necessita una temperatura menor per desfer-se. Aquesta podria ser una raó per la que les cèl·lules s'adhereixen i proliferen millor en els *stents* de PCL.

Els **resultats preliminars** amb cèl·lules endotelials de cordó umbilical (HUVEC) indiquen resultats similars als dels fibroblasts (3T3) i encoratjadors a seguir a endavant amb aquest estudi.



## Conclusions

- Cardiovascular bioresorbable stents allow cell adhesion, regardless of the material. Even so, PCL shows a greater cellular proliferation than PLA.
- Murine 3T3 fibroblasts and Endothelial cells (HUVEC) have shown a capacity for grow in stents. Preliminary results about HUVEC shown that this cell line is able to have more proliferation in stents than fibroblasts, but this results must be checked with more studies.
- Cells have the ability to adhere to any part of a stent. Even so, cells usually adhere to the pores and corns of the stent.
- Ethanol 70% and Ultraviolet light are the most efficient methods for sterilize stents that will be seeded *in vitro*. Both show complete sterilization after 8 hours.
- The surface available to cell proliferation is directly related with cell growth.
- The geometry of stent's pore did not have significant effect to cell proliferation. On the other hand, flow rate, number of cells and material have a strong effect over 3T3 growth. So all these parameters should be taken into account to obtain the ideal stent for cell proliferation. Not only one stent design incorporates all the features to the ideal stent itself.
- More studies with bioresorbable cardiovascular stents are needed to improve the knowledge about this new world. They seem to be a good medical device for arterial obstruction.

Results of this work will be published in two articles; one that talks about effects of different sterilization processes on the properties of a novel 3D-printed polycaprolactone stent, and other that study a 3D-printed composites PCL/PLA stent to improve cell proliferation in cardiovascular problems.

## Bibliografia

- Texas Heart Institute. Angioplastia con balón y colocación de stents. Recuperat de <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/angioplastia-con-balon-y-colocacion-de-stents-2/>
- Azzarit, F. A., Guzman, L. A., Kuschnir, P., & Tercelan, A. (2002). El remodelado arterial en la angina inestable. Diferencias segun la forma clinica de presentacion y el tiempo de evolucion de los sintomas. Estudio de ultrasonido intravascular. *Instituto Cardiovascular de Buenos Aires*, 70(3), 159-167. Recuperat de <https://www.sac.org.ar/wp-content/uploads/2014/07/849.pdf>
- Deora, S. (2016). The story of “STENT”: From noun to verb. *Indian Heart Journal*, 68(2), 235–237. Recuperat de <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2015.12.007>
- Grabow, N., Schlun, M., Sternberg, K., Hakansson, N., Kramer, S., & Schmitz, K.-P. (2005). Mechanical Properties of Laser Cut Poly(L-Lactide) Micro-Specimens: Implications for Stent Design, Manufacture, and Sterilization. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(1), 25. Recuperat de <https://doi.org/10.1115/1.1835349>
- Guerra, A. J., & Ciurana, J. (2018). 3D-printed bioabsorbable polycaprolactone stent: The effect of process parameters on its physical features. *Materials and Design*, 137, 430–437. Recuperat de <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.10.045>
- Guerra, A., Roca, A., & de Ciurana, J. (2017). A novel 3D additive manufacturing machine to biodegradable stents. *Procedia Manufacturing*, 13, 718–723. Recuperat de <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2017.09.118>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de fisiología médica* (ed. 10). Madrid: Elsevier Health Sciences Spain.
- Jiang, W., Tian, Q., Vuong, T., Shashaty, M., Gopez, C., Sanders, T., & Liu, H. (2017). Comparison Study on Four Biodegradable Polymer Coatings for Controlling Magnesium Degradation and Human Endothelial Cell Adhesion and Spreading. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(6), 936–950. Recuperat de <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00215>
- Lee, K. W., Wang, S., Lu, L., Jabbari, E., Currier, B. L., & Yaszemski, M. J. (2006). Fabrication and Characterization of Poly(Propylene Fumarate) Scaffolds with Controlled Pore Structures Using 3-Dimensional Printing and Injection Molding. *Tissue Engineering Part A*, 12, 2801–2811. Recuperat de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518649>
- Lutter, C., Nothhaft, M., Rzany, A., Garlichs, C. D., & Cicha, I. (2015). Effect of specific surface microstructures on substrate endothelialisation and thrombogenicity: Importance for stent design. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 59(3), 219–233. Recuperat de <https://doi.org/10.3233/CH-141839>
- McClellan, D. R., Eiger, N. L., & Eigler, N. L. (2001). Stent Design: Implications for Restenosis. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 3, S16-22. Recuperat de [http://medreviews.com/sites/default/files/2016-11/RICM\\_3suppl5\\_s16.pdf](http://medreviews.com/sites/default/files/2016-11/RICM_3suppl5_s16.pdf)
- Muramatsu, T., Onuma, Y., Zhang, Y.-J., Bourantas, C. V., Kharlamov, A., Diletti, R., ... Serruys, P. W. (2013). Avances en el tratamiento mediante intervención coronaria percutánea: el stent del futuro. *Revista Española de Cardiología*, 66(6), 483–496. Recuperat de <https://doi.org/10.1016/J.RECESP.2012.12.009>
- Serveis Tècnics de la Universitat de Girona. Microscopia Confocal. Recuperat de

<http://www2.udg.edu/serveis/STRUBM/Tecniques/MicroscopiaConfocal/tabid/20162/lanuange/ca-ES/Default.aspx>

- Shen, L., Li, Z., Gong, F., Zhang, F., Qin, Q., Cheng, S., & Ge, J. (2013). Characterization of tissue responses and degradation behavior of heparin-immobilized copolymer for drug-eluting stents. *Polymer Degradation and Stability*, *98*(5), 1015–1021. Recuperat de <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2013.02.004>
- StayWell Company. (2016). Derivación aortocoronaria con injerto (CABG). Recuperat de <https://carefirst.staywellsolutionsonline.com/spanish/TestsProcedures/92,P09307>
- Tamai, H., Igaki, K., Kyo, E., Kosuga, K., Kawashima, A., Matsui, S., ... Uehata, H. (2000). Initial and 6-Month Results of Biodegradable Poly-L-Lactic Acid Coronary Stents in Humans. *Circulation*, *102*(4), 399–404. Recuperat de <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.1.35>
- Tessarolo, F. (2008). Sterilization of Biomedical Materials. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, (December 2016), 2501–2510. Recuperat de <https://doi.org/10.3109/E-EBBE-120005526>
- Wang, G. X., Deng, X. Y., Tang, C. J., Liu, L. S., Xiao, L., Xiang, L. H., ... Guidoin, R. (2006). The adhesive properties of endothelial cells on endovascular stent coated by substrates of poly-L-lysine and fibronectin. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, *34*(1), 11–25. Recuperat de <https://doi.org/10.1080/10731190500428283>
- Xu, H., Nguyen, K. T., Brilakis, E. S., Yang, J., Fuh, E., & Banerjee, S. (2012). Enhanced endothelialization of a new stent polymer through surface enhancement and incorporation of growth factor-delivering microparticles. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *5*(4), 519–527. Recuperat de <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9381-8>