aitex®
textile research institute

STENT-NET

FABRICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UNA MALLA DE NANOFIBRAS BIODEGRADABLES CON FÁRMACO PARA EL RECUBRIMIENTO DE STENTS

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE, y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE, y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. FICHA TÉCNICA DEL PROYECTO 4
2. ANTECEDENTES Y MOTIVACIONES 6
3. OBJETIVOS DEL PROYECTO 8
4. PLAN DE TRABAJO 10
5. RESULTADOS OBTENIDOS 27
6. TRANSFERENCIA A EMPRESAS 29
7. COLABORADORES EXTERNOS DESTACADOS 32

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE, y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

1.FICHA TÉCNICA DEL PROYECTO

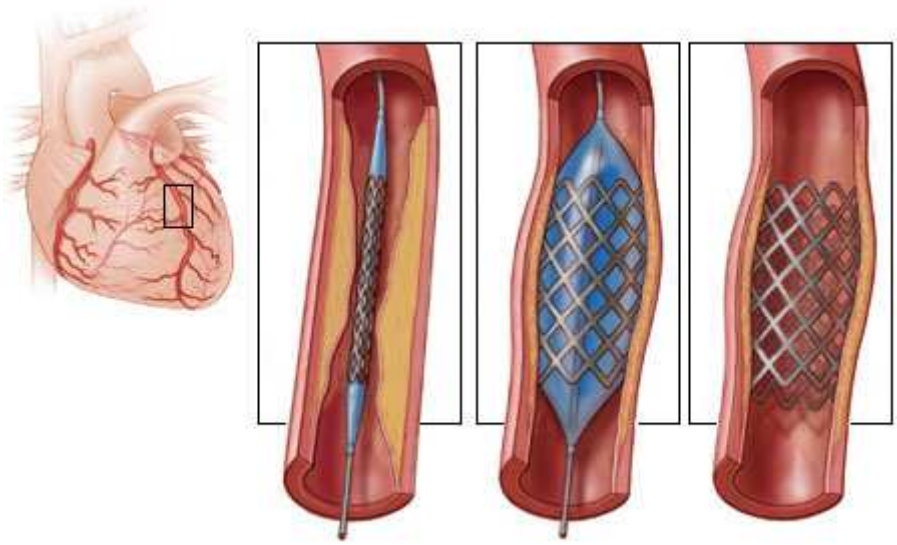
Nº EXPEDIENTE	IMDEEA/2017/35
TÍTULO COMPLETO	STENT-NET. Fabricación y optimización de una malla de nanofibras biodegradables con fármaco para el recubrimiento de stents
PROGRAMA	Proyectos de I+D en cooperación con empresas.
ANUALIDAD	2017
PARTICIPANTES	AITEX
COORDINADOR	AITEX
ENTIDADES FINANCIADORAS	IVACE – INSTITUT VALENCIÀ DE COMPETITIVITAT EMPRESARIAL www.ivace.es FONDOS FEDER – PROGRAMA OPERATIVO FEDER DE LA COMUNITAT VALENCIANA 2014-2020
ENTIDAD SOLICITANTE	AITEX
C.I.F.	G03182870

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius i Treball, a través de IVACE (Institut Valencià de Competitivitat Empresarial) y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE, y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

2.ANTECEDENTES Y MOTIVACIONES

El estrechamiento arterial causado por la arteriosclerosis es el sustrato para las dos causas de muerte más frecuentes en el mundo desarrollado: el ictus y el infarto de miocardio. Uno de los tratamientos más eficaces para aliviar estas estenosis consiste en el implante de un stent o prótesis endovascular metálica para aumentar su luz (angioplastia). Al expandir el stent, el material que compone la estenosis queda aplastado contra la pared, pudiendo introducirse entre sus celdas con el consiguiente riesgo de embolización. En el infarto de miocardio la obstrucción está causada por un trombo. Durante la intervención, parte del trombo puede protruir a través de las celdas del stent, disgregarse y embolizar. En el ictus isquémico la revascularización carotidea mediante stent es una opción plenamente validada. Prevenir la embolización distal intracerebral durante los procedimientos sigue siendo la piedra angular en la toma de decisiones. Para prevenirla, entre las soluciones utilizadas están los stents de celda cerrada o dotados de una malla. Los modelos actualmente comercializados presentan limitaciones importantes por lo que queda justificado encontrar diseños y materiales mejores.



3.OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo principal de dicho proyecto ha sido desarrollar un prototipo funcional de stent con un recubrimiento o malla de nanofibras biodegradable que libere fármacos.

Planteando conseguir un prototipo que cumpliera con las siguientes propiedades:

- Conservar las propiedades mecánicas y la capacidad de cruce del stent.
- Liberar fármacos que prevengan la reestenosis y/o la trombosis (fármacos antiproliferativos de la familia de los limus).
- Preservar el flujo por ramas laterales que puedan quedar cubiertas por el stent.
- Capacidad Bioabsorbible.
- Evitar el riesgo de embolización.

Con el fin de alcanzar el objetivo propuesto se optó por desarrollar la tecnología de electrospinning, ya que esta ofrece la posibilidad de obtener un velo de nanofibras poliméricas aplicando un alto potencial eléctrico a una disolución polimérica precursora que puede aditivarse fácilmente con los fármacos propuestos (limus).

Definiendo como objetivo final conseguir un nuevo stent basado en los disponibles actualmente, que incorpore una malla de recubrimiento de nanofibras biodegradables, capaz de soportar los requerimientos mecánicos, liberar fármacos, y evitar el riesgo de embolización tras su implantación.

4.PLAN DE TRABAJO

CRONOGRAMA DEL PROYECTO

			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
F0. Gestión y coordinación técnica	01/01/2017	31/12/2017												
F1. Preparación técnica del proyecto	01/02/2017	30/11/2017												
F2. Obtención de muestras y prototipos. Optimización	01/03/2017	31/12/2017												
F3. Caracterización de muestras y prototipos	01/03/2017	31/12/2017												
F4. Validación de prototipos en el ámbito de aplicación del proyecto	01/05/2017	31/12/2017												
F5. Conclusiones y acciones futuras	01/09/2017	31/12/2017												
F6. Difusión del proyecto	01/02/2017	31/12/2017												

TRABAJOS REALIZADOS POR PAQUETE DE TRABAJO

I. PREPARACIÓN TÉCNICA DEL PROYECTO

T1.1. Actualización de conocimientos relacionados con la materia.

Los objetivos de este paquete de trabajo eran:

- Actualizar la base de conocimiento sobre electrospinning en los campos de aplicación del proyecto.
- Estudiar los artículos y las patentes concedidas sobre los productos que se pretende desarrollar, analizar los solicitantes y la tendencia prevista respecto a años anteriores.
- Conocer el mercado de los productos existentes y las propiedades deseables de dichos productos.

Artículos técnicos.

El estudio del arte incluye artículos técnicos con la información relevante como el título, los autores, el año de publicación y el resumen del contenido técnico (abstract).

Los criterios para buscar, comprobar y seleccionar los artículos han sido los siguientes:

- Tiempo: máximo 10 años de antigüedad (se consideran válidas los artículos publicados entre el 2007 y el 2017).
- Geografía: artículos técnicos publicados en cualquier revista, búsqueda global.
- Keywords: *electrospinning* o *electrospun, nanofiber*, *stent*.

El estudio se acompaña con gráficos para ilustrar de forma visual la evolución de los artículos científicos publicados según los últimos años.

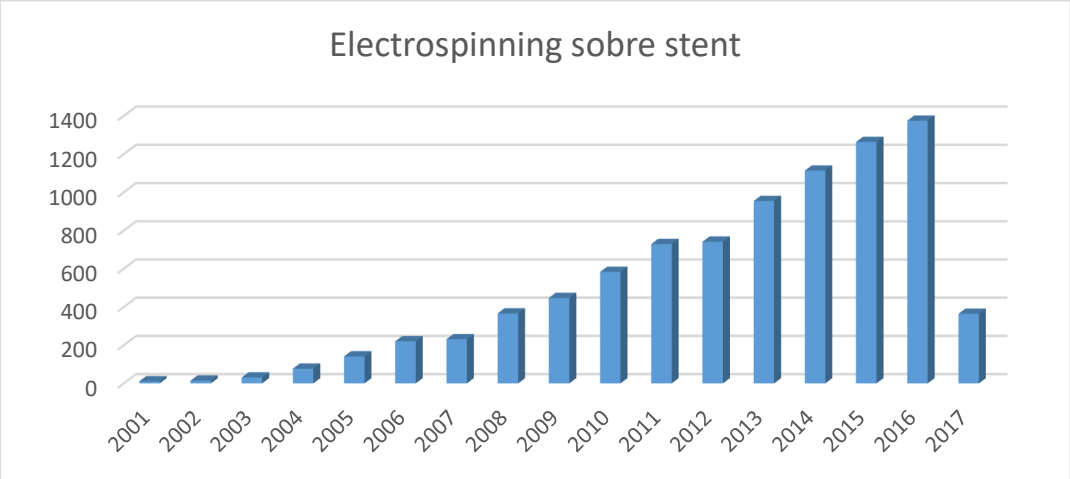


Figura 1. Número de publicaciones de artículos relacionados con la tecnología de electrospinning sobre stent.

Podemos observar que la tendencia es ascendente, es decir, que el número de artículos publicados aumenta año tras año. Aunque los datos del 2017 no están actualizados.

Tras el estudio de su evolución, podemos deducir que seguirá aumentando su tendencia en los próximos años, aunque poco a poco ya que es un tema relativamente nuevo que empieza a despuntar.

Patentes.

El estudio de patentes incluye una tabla con las patentes y la información más importante de cada una de ellas, acompañada de una imagen de la primera página de cada patente de interés hallada, en la que se pueda observar el título, el tipo de patente, el año de publicación y el resumen del contenido técnico (abstract). Los resultados se han ordenado según el interés de los trabajos a desarrollar en el proyecto.

Los criterios para buscar, comprobar y seleccionar patentes han sido los siguientes:

- Tiempo: máximo 10 años de antigüedad (se consideran válidas los artículos publicados entre el 2007 y el 2017).

- Geografía: nacionales, europeas y también norteamericanas y mundiales (WCT/WO).

- Keywords: *electrospinning* o *electrospun, nanofiber*, *stent*.

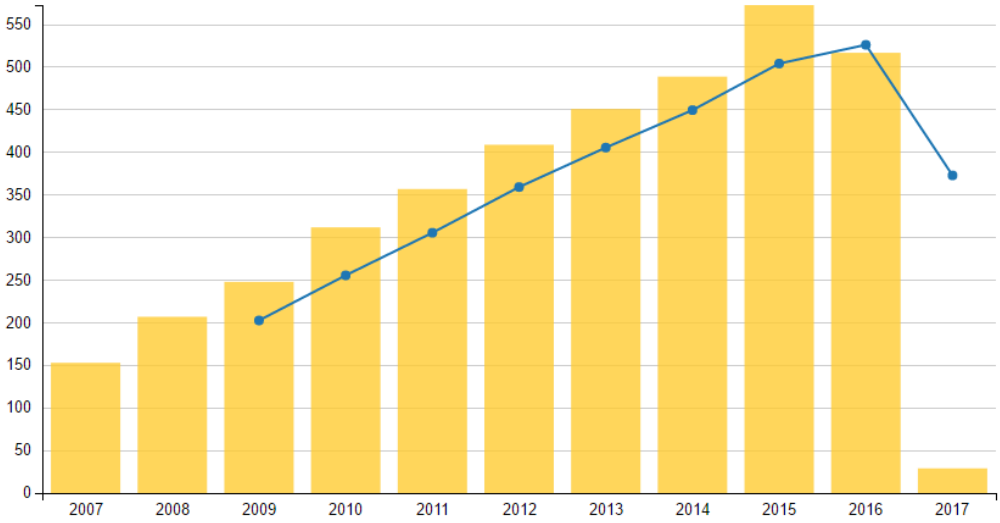


Figura 2. Evolución del número de patentes basadas en el electrospinning (en general).

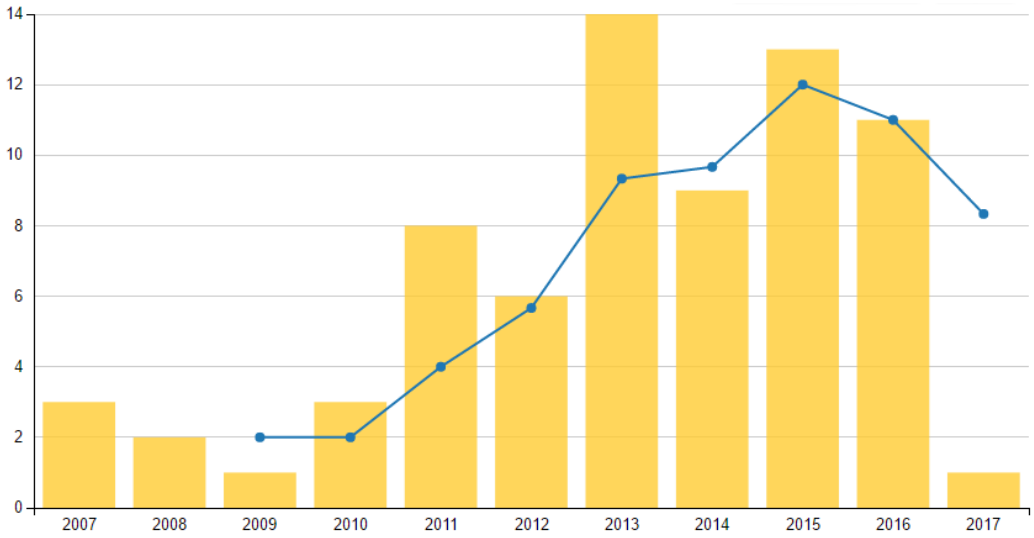


Figura 3. Patentes sobre el uso del electrospinning para el recubrimiento de stents

Los datos del 2017 no están actualizados; por lo que es un valor que no tendremos en cuenta a la hora de determinar la tendencia. Podemos ver que el tema de electrospinning en general es un tema que sigue creando patentes y cuya ascendencia se debe a la multitud de aplicaciones que posee. En el campo de los stents podemos ver como se mantiene relativamente estable ya que se necesita mucha investigación previa antes de publicar cualquier patente.

Figura 4. Campos principales de aplicación del electrospinning para el recubrimiento de stents.

El electrospinning es una técnica aplicable a múltiples sectores. Como podemos ver en el primer gráfico estos campos son:

- Necesidades humanas.
- Operaciones de transporte.

- Química y metalúrgia.
- Textil y papel.
- Ingeniería mecánica y eléctrica.
- Nuevas tecnologías.

Figura 5. Número de patentes por países sobre electrospinning para recubrimiento de stents

Se han utilizado herramientas de búsqueda de artículos y bases de datos como *pubmed.gov*; así como herramientas de búsqueda y gestión de patentes como *Google Patents* y *Patent Inspiration*.

Productos relacionados.

Se ha realizado un estudio sobre la recapitulación de productos existentes en el mercado relacionados con la materia.

La búsqueda se ha referido a cualquier producto basado en stents, stents recubiertos de fármaco y velos de nanofibras sobre stents para aplicación biomédica. En dicho proceso se ha recopilado la información existente y posteriormente se han valorado los pros y los contras de cada producto.

El producto más destacado entre los diferentes productos analizados es un stent recubierto con fármaco (Xience Alpine) Este stent está dotado de medicamento para liberación pero no posee ningún tipo de malla para evitar el posible filtrado de partículas de la placa de ateroma entre las rendijas del mismo al ser expandido.

Figura 6. Stent coronario recubierto de fármaco.

T1.2. Preparación de disoluciones y protocolo de obtención.

En este apartado se han realizado dos líneas de investigación:

- Descripción de un protocolo de obtención (mediante las instrucciones pertinentes para la preparación de disoluciones precursoras y soportes, descripción y preparación de los equipos y sus operaciones, post-tratamientos, caracterización, envasado)

- Cálculos, dosis y procesos necesarios para obtener las disoluciones poliméricas de *DL-PLG*, con y sin fármaco *Everolimus* (necesarias para la producción de los velos de nanofibras que serán depositados sobre el stent mediante la tecnología de *Electrospinning*).

El polímero *DL-PLG (50:50 Poly (DL-lactide-co-glycolide))* se trata de un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico terminado en un grupo ester. Es de base biológica y biodegradable. Se utiliza en aplicaciones biomédicas. Los polímeros de PLG son biodegradables, biocompatibles, no inmunogénicos y con perfiles de liberación controlables que van desde varias semanas a meses.

El fármaco utilizado *Everolimus*, es un fármaco inmunosupresor utilizado para el rechazo de trasplantes. Actúa como un inhibidor de la señal de la proliferación que actúa modificando las señales fisiológicas que modulan el crecimiento y la proliferación celular al inhibir la acción de las células T y las células del músculo liso.

Se han realizado tres clases de disoluciones. Una sin fármaco (control) y dos con diferentes concentraciones de Everolimus. La finalidad de las mismas era aportar una cantidad determinada de fármaco en cada stent. Dichas dosis han sido determinadas por doctores cirujanos especialistas en cirugía cardiovascular del Hospital La Fe y técnicos especializados de la Asociación de Investigación de la Industria Textil (AITEX).

II. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROTOTIPOS. OPTIMIZACIÓN

Los objetivos de este paquete de trabajo eran:

- Fabricar velos de nanofibras mediante electrospinning como recubrimiento de un stent metálico.
- Aditivar los velos de nanofibras con sustancias antimitóticas, como fármacos *everolimus*.
- Conseguir una resistencia del velo suficiente para garantizar la correcta implantación del stent.
- Realizar una prueba de navegabilidad en simulador de implantación de stents.

En primer lugar se han realizado pruebas de electrospinning sobre papel encerado (con y sin fármaco) y sobre stents (sin fármaco) para realizar estudios sobre citotoxiciad, bioburden y cultivos con células.

Una vez determinada la dosis de fármaco óptima se ha procedido al recubrimiento con nanofibras aditivadas sobre stents coronarios.

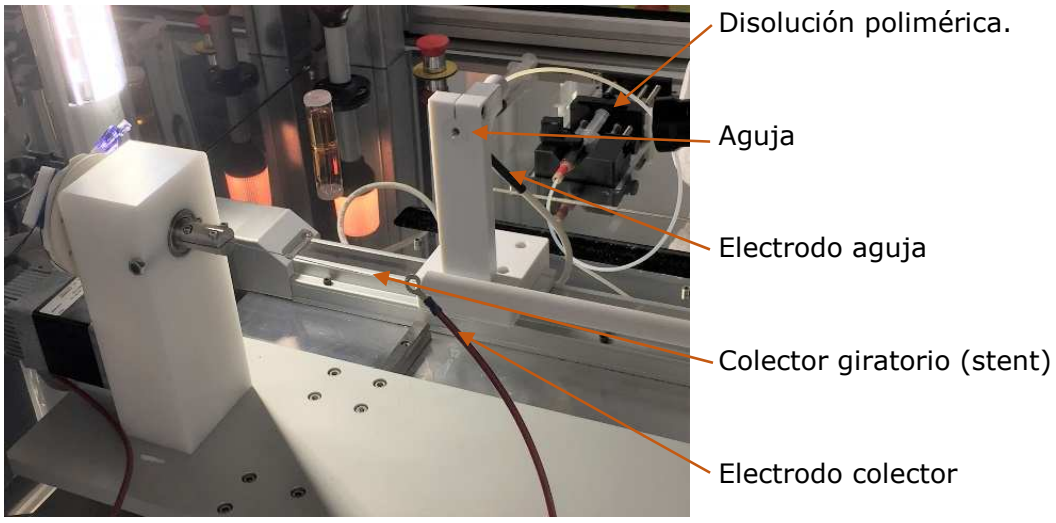


Figura 7. Detalle esquemático del sistema colector giratorio para stents y sus principales componentes.

Inicialmente se han realizado velos de nanofibras sin fármaco, recubriendo los stents, para determinar el gramaje óptimo que permitiese ser manipulado, guíado e implantado tanto en un simulador de navegabilidad de stents del I.I.S La Fe como en un modelo animal.

Las muestras de stents recubiertos de velos con nanofibras han ido perfeccionándose al ser sometidas a pruebas como:

- introducción a través de distintas válvulas de inserción arterial
- limpieza, por distintos sistemas, de excedentes de velo de nanofibras en los extremos del stent
- expansión del stent
- navegabilidad e implantación en simulador del I.I.S. La Fe

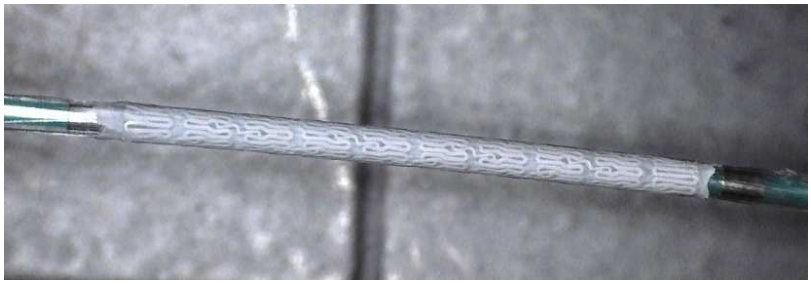


Figura 8. Stent coronario recubierto con velo de nanofibras tras proceso de electrospinning, sin expandir..

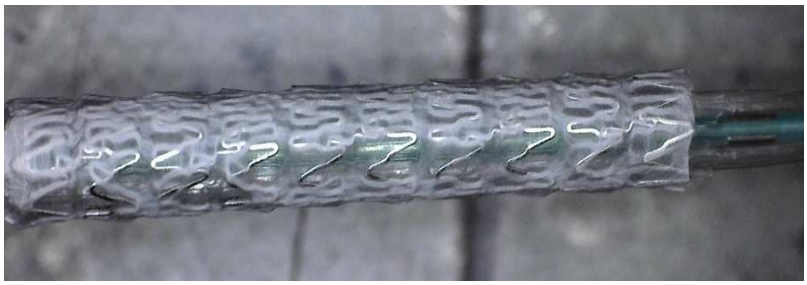


Figura 9. Stent coronario recubierto con velo de nanofibras tras proceso de electrospinning, tras su expansión.

Para validar la viabilidad de los prototipos se han realizado varias pruebas con un simulador de navegabilidad e implantación de stents del I.I.S. La Fe para determinar el gramaje y elasticidad necesarios que debe poseer el velo de nanofibras que recubre un stent para resistir el proceso de colocación, antes de proceder a realizar pruebas en modelo animal.

Figura 10. Detalle de stents implantados en la silicona del simulador de stents en funcionamiento.

Durante las pruebas de navegabilidad e implantación con el simulador de stents se ha validado la resistencia necesaria de un velo de nanofibras para recubrir un stent coronario aumentándose su gramaje hasta obtener una cantidad óptima y funcional, capaz de albergar la cantidad predefinida de fármaco y cumpliendo todos los requisitos de viabilidad.

Una vez obtenidas las variables óptimas de proceso de preparación, electrospinning y acabado de la muestra para obtener el prototipo ideal, se ha preparado una batería de muestras con fármaco Everolimus.

Dichas muestras se han utilizado en el modelo animal *in vivo* con conejos (descrito en el siguiente apartado IV. Validación de prototipos del presente informe).

III. CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS Y PROTOTIPOS.

Se realiza un estudio morfológico de cada muestra obtenida mediante la visualización a través de un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Muestra: 2-Prueba34 (Stent sin expandir y sin Everolimus)

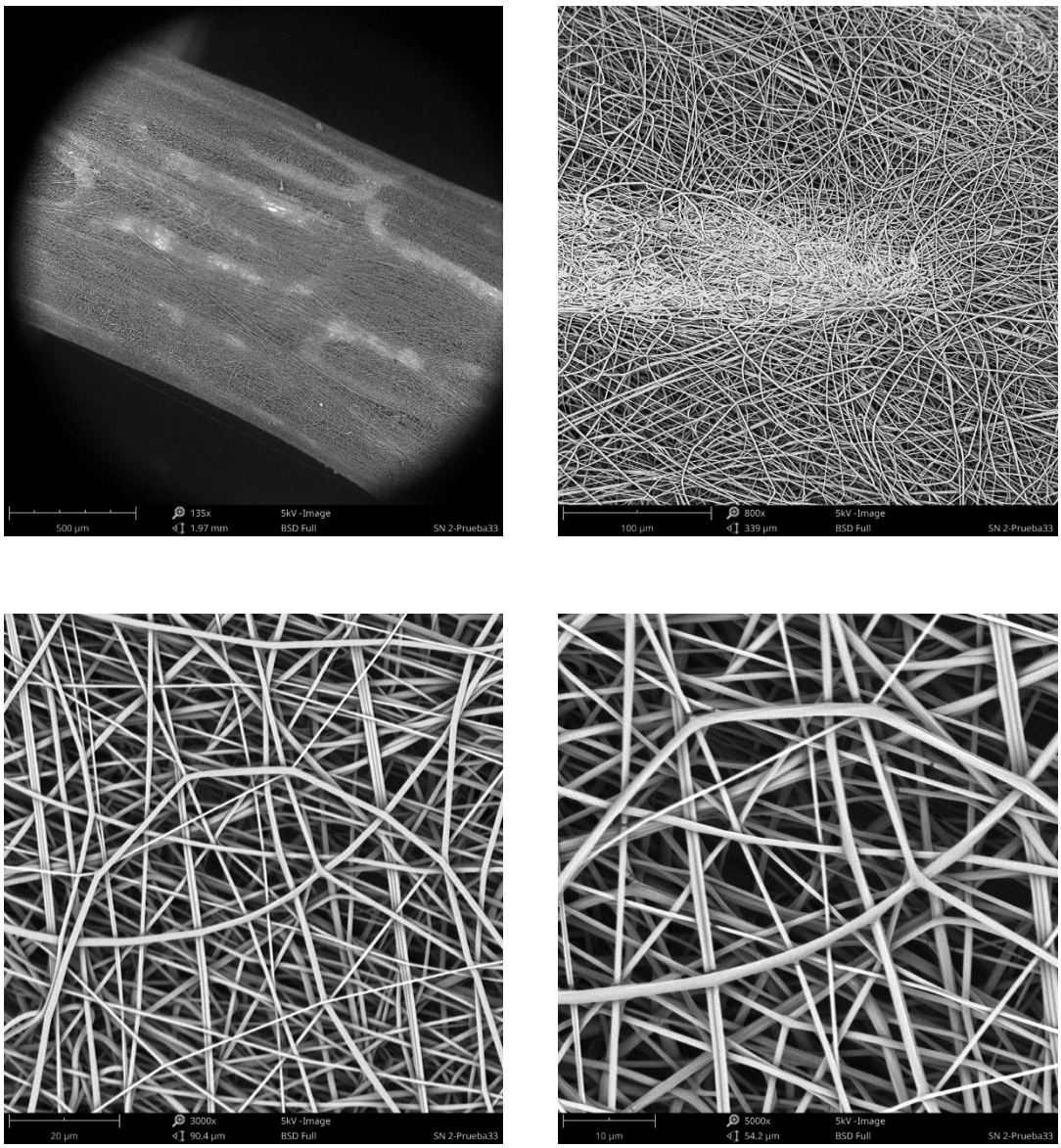


Figura 11. Muestra 2-Prueba34. Visión SEM a x150, x800, x3000 y x5000.

Muestra: 2-Prueba40 (Stent expandido y sin Everolimus)

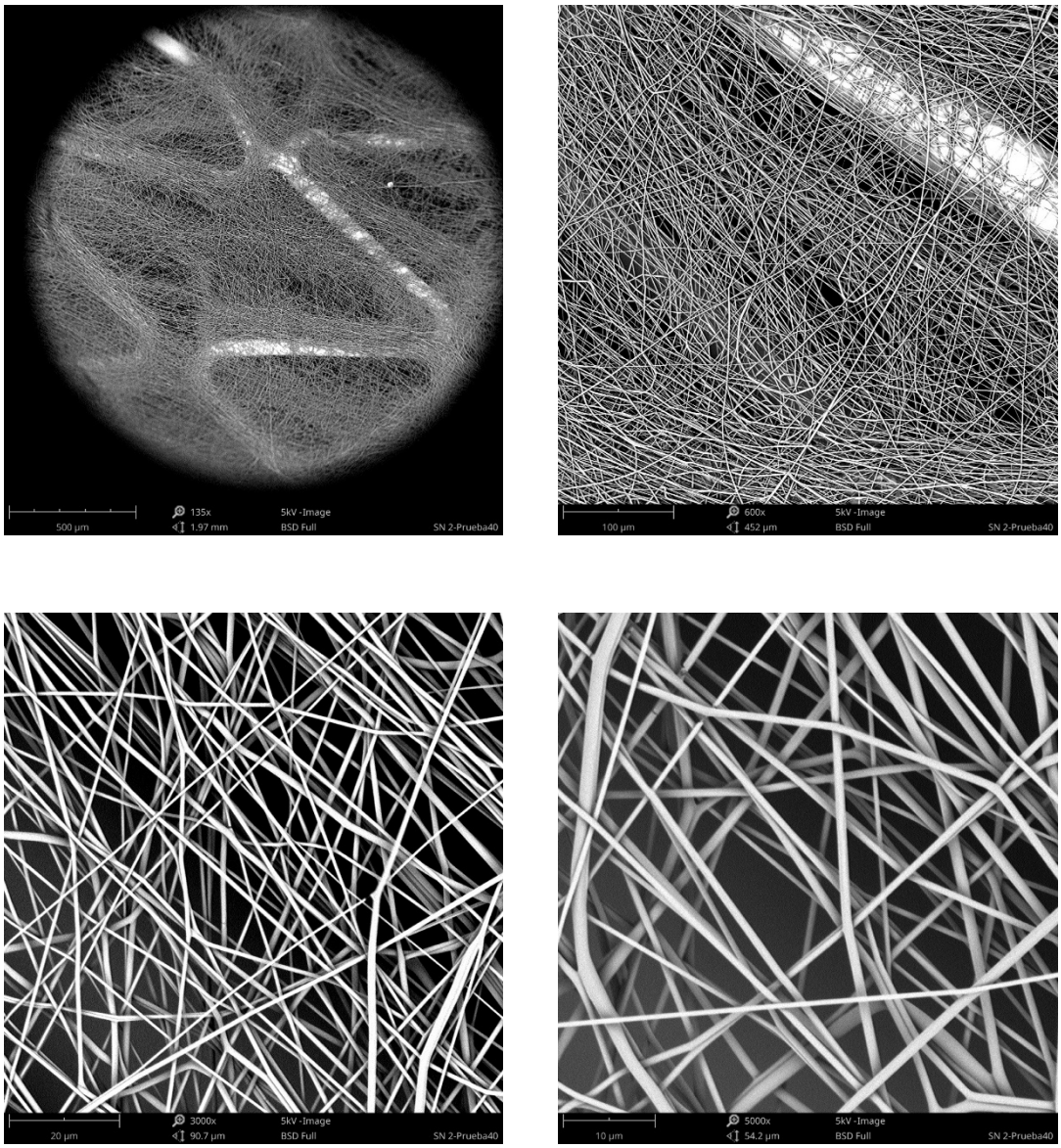


Figura 12. Muestra 2-Prueba40. Visión SEM a x150, x600, x3000 y x5000.

Por medio de un software de análisis de diámetros de nanofibras, se obtienen los histogramas. Con ellos se determina que las nanofibras obtenidas se sitúan en un rango aproximado entre 600 y 1200 nanómetros.

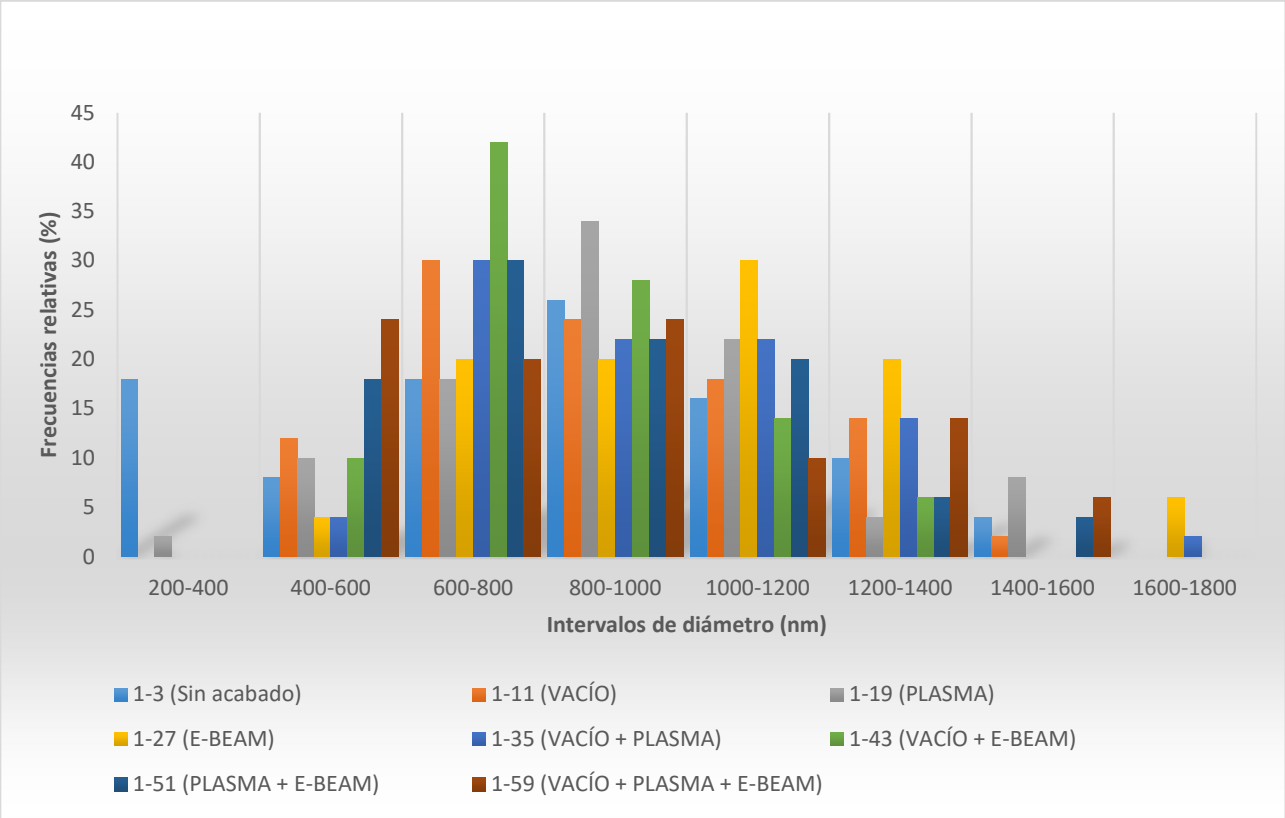


Figura 13. Comparación de histogramas de las muestras de nanofibras sometidas a diferentes acabados.

Ensayos BIOBURDEN

El ensayo se basa en las normas UNE-EN ISO 11737-1: 2007 + UNE-EN 11737-1: 2007/AC:2009 o en la Farmacopea Española o Europea.

El objetivo de este ensayo es determinar el número de microorganismos viables en el producto, o crecimiento total de microorganismos, (recuento total de gérmenes aerobios y de mohos y levaduras). Se evalúa de este modo la calidad sanitaria de los productos analizados, además de las condiciones higiénicas de la materia prima y de la manipulación del mismo previa a la esterilización.

En todas las muestras estudiadas los resultados están muy por debajo del nivel máximo del requisito, por lo que cualquier muestra, con o sin acabado, de los velos de nanofibras obtenidos (tanto sobre papel como sobre stent) cumplirían la norma UNE-EN 13795:2011+A1:2013.

Ensayos citotoxicidad

Se realiza según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009. Este ensayo evalúa el potencial citotóxico de los productos. Este método 'in vitro' especifica la incubación de células de cultivo en contacto con un producto y/o extractos de un producto durante un período de tiempo, tras el cual se valora cuantitativa y cualitativamente la respuesta biológica de las células.

Todas las muestras estudiadas cumplen exitosamente la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 de citotoxicidad.

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE, y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

IV. VALIDACIÓN DE PROTOTIPOS.

Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* para validar las muestras realizadas, sus resultados y funcionalidad.

Ambos estudios se han llevado a cabo con la colaboración entre el Instituto de Investigación Sanitaria de La Fe, el servicio de Microscopía de la Universidad de Valencia y Aitex.

En el estudio *in vitro* se pretendía conocer la viabilidad y proliferación celular en los velos de nanofibras de DL-PLG, que actuarían como plataforma para el crecimiento celular además de almacenar y liberar de forma progresiva sustancias antiproliferativas como el everolimus.

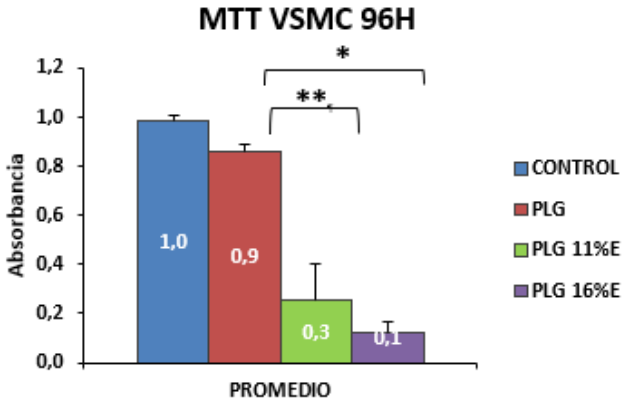


*Figura 14. Representación de la absorbancia media en VSMC a las 96h para PLG con o sin everolimus (*p<0,05; **p<0,01).*

De dicho estudio se extrae, entre otros resultados, que la liberación de everolimus al medio a través de los velos de DL-PLG ha ocasionado una disminución estadísticamente significativa (p<0,05) en la proliferación de células de músculo liso (VSMC), siendo mayor esta disminución en los velos cargados con mayor concentración de everolimus (16% everolimus) y con respecto al tiempo.

El estudio *in vivo* con modelo de conejo fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal La Fe.

Con los estudios de los cortes histológicos obtenidos, se ha pretendido observar:

- La reendolelización
- La adhesión de plaquetas en las paredes vasculares

Con los datos obtenidos en el análisis mofométrico de las capas arteriales se ha medido el grado de reestenosis arterial post-implantación de cada uno de los stents utilizados.

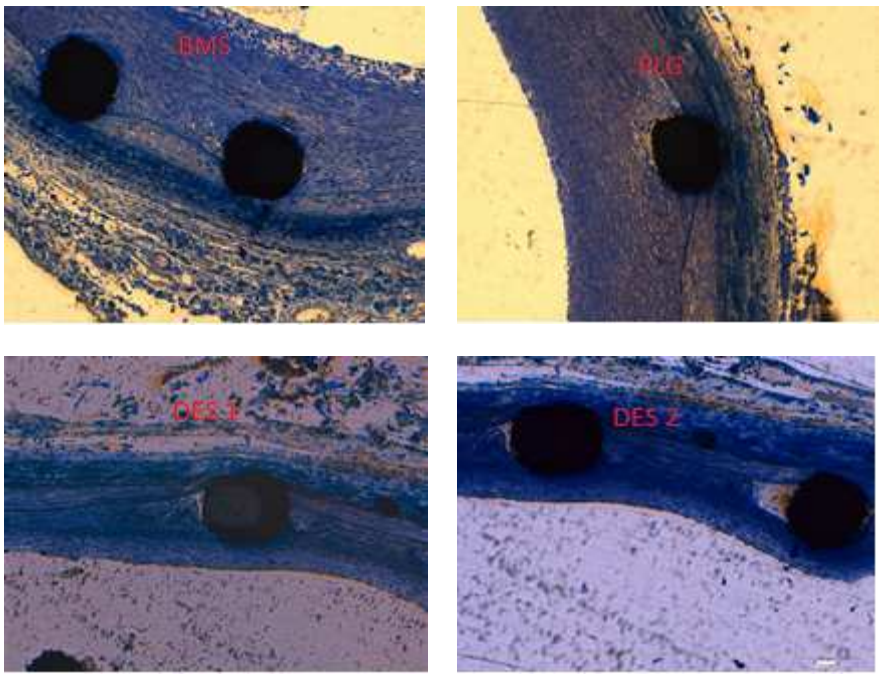


Figura 15. Cortes histológicos de arterias con stents sin recubrir (BMS), recubiertos con velos de DL-PLG (PLG), con velos de DL-PLG con Everolimus 1.75% wt (DES 1) y con velos de DL-PLG con Everolimus 2.2% wt (DES 2).

A la vista de las imágenes de los resultados obtenidos, se sigue corroborando los datos existentes en otras publicaciones sobre el efecto rechazo del organismo al instalar un stent. El aumento en la restenosis al colocar un stent con velo de nanofibras era esperable puesto que añadimos un elemento más con capacidad para fijar células y mejorar su crecimiento; sin embargo, este efecto se ha contrarrestado positivamente con la aplicación de nuevas muestras con gramajes y concentraciones óptimas de Everolimus con las que se ha conseguido disminuir el efecto con la acción del fármaco.

5.RESULTADOS OBTENIDOS

Se han alcanzado los siguientes resultados:

- Desarrollo de velos de nanofibras con el tamaño y la geometría de fibras adecuadas para conseguir la correcta interacción con los tejidos endoteliales y de músculo liso. Dichos velos cumplen con los siguientes requisitos:
    - Homogeneidad de las nanofibras y del velo para cubrir completamente el stent.
    - No presentan excedentes de velo de nanofibras en los extremos del stent.
    - Elasticidad suficiente para resistir la expansión del stent y una vez expandido, mantener la distribución homogénea de la porosidad del velo.
- Stents recubiertos con un velo de nanofibras de gramaje optimizado para mantener las características mecánicas y de navegabilidad, una correcta elasticidad, y la carga de fármaco adecuada para conseguir evitar la reestenosis intra-stent.
- Se ha estudiado el manejo-clínico en un simulador de navegabilidad y colocación de stents para su puesta a punto.
- Realización de estudios preclínicos in vitro y en modelo de reestenosis animal. Comparando mediante evaluación histológica de stents convencionales y stents recubiertos con velo de nanofibras con fármaco.

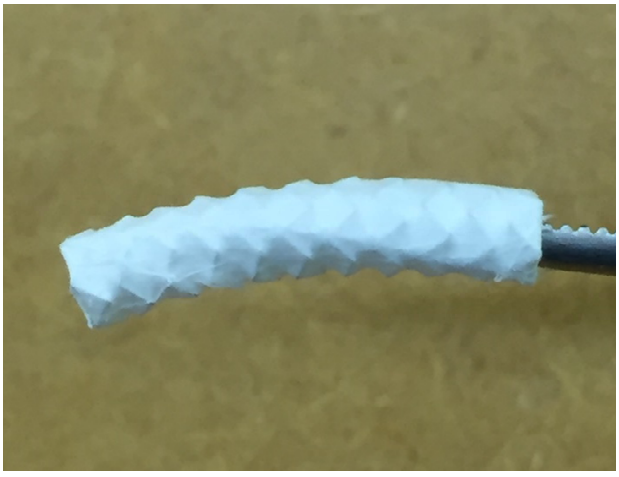


Figura 16. Stent coronario recubierto con velo de nanofibras y expandido. Estado resultante tras prueba de 48 horas en el simulador de navegabilidad e implantación de stents del I.I.S. La Fe

6.TRANSFERENCIA A EMPRESAS

En cuanto a la transferencia y promoción de resultados, se ha realizado una colaboración con la empresa BioInica, S.L. con sede en la Comunidad Valenciana y perteneciente al sector de los servicios técnicos de ingeniería. Está especializada en la ingeniería biotecnológica dedicada al desarrollo, fabricación y comercialización de maquinaria y servicios en el ámbito del procesado electro-hidrodinámico y/o aero-hidrodinámico, así como la fabricación de producto farmacéutico, sanitario, biomédico, productos destinados a alimentación y otros productos.

Participando en las siguientes fases:

FASE 1. Preparación técnica del proyecto.

-Tarea 1.1. Actualización de conocimientos relacionados con la materia.

Revisión, validación y ampliación de la información generada en esta tarea.

-Tarea 1.2. Adquisición de materiales.

Se han diseñado una serie de modificaciones en el equipamiento base de electrospinning, con el fin de optimizar la producción de stents recubiertos con nanofibras.

FASE 2. Obtención de muestras y prototipos. Optimización.

-Tarea 2.2. Obtención de prototipos de stents recubiertos.

La empresa ha ampliado su conocimiento respecto a la aplicación que puedan tener sus equipos en el desarrollo de productos biomédicos para cirugía cardiovascular.

Aplicaciones finales que con sus equipos actuales no se pueden llegar a desarrollar de forma óptima.

La empresa ha participado en la optimización del producto desde un punto de vista productivo, teniendo presente la futura producción y explotación del producto. La colaboración se ha basado en reuniones para comunicar resultados e idear optimizaciones del proceso.

FASE 4. Validación de prototipos en el ámbito de aplicación del proyecto.

-Tarea 4.1. Estudio de la normativa y regulación aplicada en el ámbito del proyecto.

Se ha aportado información y experiencia relativa a las reglamentaciones existentes en cuanto a la fabricación de productos sanitarios.

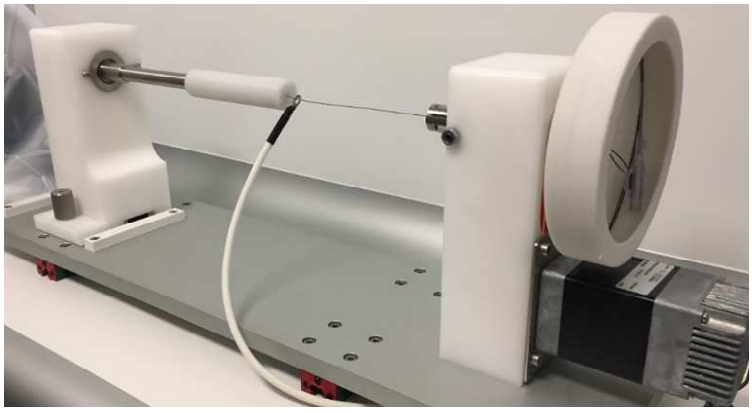


Figura 17. Vista general del útil recubridor de stents para el equipo Fluidnatek LE500 (modificado).

En la anterior imagen aparecen las dos modificaciones realizadas. Apareciendo a la derecha de la imagen el nuevo dispositivo de sujeción de las guías de los stents y en el centro, la nueva colocación del electrodo colector.

Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE, y está cofinanciado por los fondos FEDER de la UE, dentro del Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014-2020.

7.COLABORADORES EXTERNOS DESTACADOS

I. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE

El trabajo realizado por el Servicio Externo del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) ha sido la validación de las muestras y prototipos *in vitro* e *in vivo* en modelo animal.

Dividiendo su trabajo en las siguientes tareas:

T.1. Estudio mediante cultivo celular in vitro de muestras sin fármaco y depositadas sobre papel, tratadas y sin tratar con plasma. Pruebas con líneas celulares de endotelio y de músculo liso.

COLECTOR	***FÁRMACO***	***TRATAMIENTO PLASMA***	***CULTIVO CELULAR***	***MUESTRAS***	***TOTAL***
Papel encerado	***No***	***No***	***Endotelio***	***x 5***	***20***
			Músculo liso	***x 5***	
		Si	***Endotelio***	***x 5***	
			Músculo liso	***x 5***	

Cada muestra se ha ensayado por quintuplicado (4 ensayos diferentes x 5 muestras incluyendo los controles sin muestra = 20 muestras).

Ensayos de viabilidad y proliferación celular para determinar la capacidad de endotelización en ausencia de crecimiento exacerbado del musculo liso, experimentos que han servido de control para los ensayos posteriores.

T.2. Estudio de los cultivos celulares para muestras optimizadas con fármacos añadidos. Sobre la base de muestras seleccionada en el estudio anterior (tratamiento con plasma según cultivo celular) se añaden fármacos para modificar el crecimiento celular y se realizan nuevos ensayos.

COLECTOR	***FÁRMACO***	***TRATAMIENTO PLASMA***	***CULTIVO CELULAR***	***MUESTRAS***	***TOTAL***
Papel encerado	***Si (2 dosis)***	***Si/No***	***Endotelio***	***x 5***	***10/dosis***
			Músculo liso	***x 5***	

Cada muestra se ensaya por quintuplicado (2 ensayos diferentes x 5 muestras incluyendo los controles sin muestra = 10 muestras). Se estima el análisis de 2 dosis de fármaco (20 muestras).

En este caso se ha ensayado el efecto de la adición al polímero de un único fármaco facilitado por AITEX en el crecimiento de las células endoteliales y de músculo liso. El número de ensayos corresponde al indicado en la tabla.

T.3. Estudio de aplicación de stents recubiertos con nanofibras en un modelo válido de simulación y práctica de aplicación de stents intravasculares. Análisis de los inconvenientes frente a los modelos sin recubrimiento de nanofibras, y entre los modelos recubiertos, estudio de las diferencias existentes según el gramaje de fabricación.

COLECTOR	***FÁRMACO***	***TRATAMIENTO PLASMA***	***RECUBRIMIENTO NANOFIBRAS***	***MUESTRAS***	***TOTAL***
Stents	***No***	***No***	***No***	***x 1***	***7***
			Si – Gramaje 1	***x 2***	
			Si – Gramaje 2	***x 2***	
			Si – Gramaje 3	***x 2***	

Los stents han sido validados en un simulador diseñado para tal efecto de forma que se ha evaluado la resistencia del recubrimiento de nanofibras que tapiza el stent al paso del flujo en función del gramaje de dicho recubrimiento.

T.4. Estudio in vivo de restenosis en modelo animal de conejo. Aplicación de los stents seleccionados con los velos de nanofibras y de stents sin velos para el posterior estudio histológico.

COLECTOR	***FÁRMACO***	***RECUBRIMIENTO NANOFIBRAS***	***MUESTRAS***	***TOTAL***
Stents	***No***	***No***	***x 2***	***6***
	Si – Dosis 1	***Si – Gramaje (1/2/3)***	***x 2***	
	Si – Dosis 2	***Si – Gramaje (1/2/3)***	***x 2***	

Los stents se han introducido en la arteria ilíaca de conejos y se ha evaluado el grado de reendotelización y de hiperplasia de la capa íntima de la arteria.