

ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE STENTS METÁLICOS EN MODELO DE CULTIVO “IN VITRO” CON CÉLULAS EPITELIALES RESPIRATORIAS Y FIBROBLASTOS.

E. Arellano Orden^{1,2}, V. Sánchez López^{1,2}, F. Yubero Valencia³, Eduardo Márquez Martín^{1,2,4}, C. Serrano Casorrán⁵, F. Rodríguez Panadero^{1,4}.

¹Laboratorio de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IbiS).

²CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

³Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla (ICMS). CSIC – Universidad de Sevilla.

⁴Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias (UMQER), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

⁵Grupo de Técnicas Mínimamente Invasivas (GITMI), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Los autores quieren expresar su especial agradecimiento al Profesor Luís Labajos Broncano, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura, por su generosa colaboración en el estudio de la composición de los stents usados en el presente trabajo. Asimismo, agradecer al laboratorio ICP/MS-L 170 del Servicio Interdepartamental (Sidi) de la Universidad Autónoma de Madrid, por la caracterización elemental de los sobrenadantes

Resumen

Objetivo: investigar la posible degradación de stents metálicos tras co-cultivo con células respiratorias in vitro.

Método: durante 21 días se han co-cultivado con la línea CRL-4011 (epitelial) y MRC-5 (fibroblastos) tres tipos de stents: Wallstent® (aleación de cobalto-cromo-níquel y molibdeno), Zilver PTX® y Zilver Flex® (nitinol, aleación de níquel-titanio, con y sin liberación de paclitaxel, respectivamente). Las mismas células sin stent sirvieron como control. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron los días 3, 9, 15 y 21, se alicuataron y almacenaron a -800 C. Mediante espectrometría de masas (ICP/MS) se investigaron los niveles de titanio, cromo, níquel, cobalto y molibdeno en los sobrenadantes, y también se han analizado los niveles de esos mismos elementos en el medio de cultivo original (antes de añadirlo a los cultivos celulares).

Resultados: en todos los experimentos se encontraron mayores niveles de elementos metálicos en los sobrenadantes recogidos en el tercer día de cultivo, tanto de células epiteliales como de fibroblastos, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,002$). Los sobrenadantes de los cultivos de células epiteliales con Wallstent mostraron los niveles más altos de níquel y cobalto respecto a los controles ($p = 0,001$), y los niveles de titanio fueron más altos en los cultivos de Zilver Flex y PTX, constituidos por una aleación de níquel y titanio ($p < 0,001$).

Conclusiones: hemos detectado una rápida liberación en el sobrenadante de todos los cultivos de los elementos constitutivos de los tres stents que incluimos en los experimentos, y con niveles muy superiores a los cultivos controles.

Palabras clave: stents, cultivos celulares, cobalto, níquel, titanio.

DEGRADATION ANALYSIS FOR METAL STENTS IN AN IN VITRO CELL CULTURE MODEL WITH RESPIRATORY EPITHELIAL CELLS AND FIBROBLASTS

Abstract: Objective: To investigate the possible degradation of metal stents after co-culture with respiratory cells in vitro.

Methods: Three types of stents were co-cultured with the CRL-4011 line (epithelial) and the MRC-5 line (fibroblasts): Wallstent® (cobalt-chromium-nickel-molybdenum alloy), Zilver PTX® and Zilver Flex® (nitinol, nickel-titanium alloy, with and without paclitaxel release, respectively). The same stentless cells served as the control group. Culture supernatants were collected on days 3, 9, 15 and 21, aliquoted and stored at -80 °C. The levels of titanium, chromium, nickel, cobalt and molybdenum in the supernatants were studied using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and the levels of the same elements were also analyzed in the original culture medium (before adding them to the cell cultures).

Results: In all experiments, higher levels of metal elements were found in the supernatants collected on the third day of culture, for both epithelial cells and fibroblasts, with statistically significant differences ($p < 0.002$). The supernatants of epithelial cell cultures with Wallstent showed the highest levels of nickel and cobalt in comparison to controls ($p = 0.001$), and titanium levels were higher in Zilver Flex and Zilver PTX cultures, consisting of a nickel-titanium alloy ($p < 0.001$).

Conclusion: We have detected a rapid release in the supernatant of all the cultures of the constituent elements of the three stents that we included in the experiments, and with levels much higher than those of the control cultures.

Keywords: stents, cell cultures, cobalt, nickel, titanium.

Recibido: 08.06.2018. Aceptado: 05.12.2018

Dr. Arellano Orden.

elena_arellano8@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La obstrucción de la vía aérea central (tráquea y/o bronquios principales, con afectación benigna o maligna) constituye un grave problema en la práctica clínica, con grave deterioro de la calidad de vida y riesgo de evolución fatal.

La afectación traqueal maligna puede sobrevenir como consecuencia del desarrollo de una neoplasia primaria en el propio tejido traqueal, extensión a la luz traqueal de un tumor adyacente a ella, aparición de metástasis traqueales de otra neoplasia (generalmente pulmón) o compresión extrínseca por un tumor ubicado en el mediastino. Aproximadamente el 30% de los cánceres de pulmón presentarán afectación de vía aérea central en un momento u otro de su evolución, requiriendo maniobras de broncoscopia intervencionista y eventual colocación de stents en la vía aérea.

Entre las estenosis traqueales no malignas, las secuelas de intubación traqueal (incluso durante un corto período de tiempo) o la traqueotomía son sus principales responsables. La incidencia estimada de estenosis traqueales benignas con síntomas respiratorios graves se estima en un 2% de todos los pacientes sometidos a intubación traqueal. En los pacientes sometidos a trasplante pulmonar la incidencia de estenosis en la zona de anastomosis bronquio-bronquial supera el 30%. El manejo adecuado de estas estenosis no tumorales implicaría la reconstrucción quirúrgica en muchos casos, pero en otros muchos no sería factible, bien por la extensión de la estenosis o por la delicada situación del paciente. Como tratamientos paliativos se contemplan la dilatación mecánica, aplicación de láser, electrocoagulación o crioterapia, pero concluyendo con implantación de uno o varios stents en la mayoría de los casos, con objeto de evitar las recidivas.

Hay dos grandes tipos de stents: los metálicos autoexpandibles y los de silicona. Aunque los stents metálicos se colocan con relativa facilidad, su retirada es muy difícil o imposible tras varias semanas en la vía aérea, y por ello se prefiere la introducción de stents de silicona, especialmente en las estenosis no tumorales. Sin embargo, la relación entre diámetro interno y externo es más favorable en los stents metálicos (lo que resulta especialmente importante en estenosis muy estrechas o en pacientes pediátricos). Por otro lado, los de silicona requieren broncoscopia rígida y anestesia general para su introducción, mientras que los metálicos autoexpandibles se pueden colocar mediante fibrobroncoscopio, con anestesia local y sedación,

y suelen adaptarse mejor a las irregularidades de la vía aérea.

Los stents metálicos más usados en la actualidad están constituidos básicamente por una aleación de níquel y titanio (*nitinol*), biomaterial super-elástico que permite grandes deformaciones en tamaño y forma, y que además tiene "memoria de forma", de modo que a bajas temperaturas es fácilmente deformable, mientras que a la temperatura corporal recupera la forma que originalmente se le dio en el momento de su fabricación. Los stents de nitinol no cambian de longitud cuando se han expandido, son suficientemente flexibles para soportar la presión inducida por los golpes de tos, y mantienen adecuada fuerza radial frente a una compresión constante por tumor o estenosis. No obstante, los stents metálicos pueden provocar graves complicaciones, como la producción de tejido de granulación (que también aparece con frecuencia en los extremos proximal y distal de los stents de silicona), obstrucción por moco con sobreinfección secundaria (también frecuente en los stents de silicona), y pueden sufrir migración o fractura. La retirada de un stent metálico puede provocar graves lesiones traqueales, sangrado y re-obstrucción con fallo respiratorio agudo, y en muchas ocasiones es completamente imposible, por la intensa re-epitelización y presencia de tejido de granulación.

Además de los problemas mencionados más arriba, la degradación del material constitutivo de los stents y potencial liberación de elementos metálicos en el tejido vecino y/o en órganos distantes es motivo de creciente preocupación^{1, 2,3} y el stent ideal tendría que ser plenamente biocompatible para minimizar la formación de tejido de granulación.

Hay indicios suficientes de que las aleaciones metálicas constitutivas de los stents, y en particular la de nitinol (la más usada en la actualidad), son capaces de liberar elementos metálicos potencialmente tóxicos⁴, y en el presente estudio nos proponemos investigar este problema, que podría estar relacionado con muchas de las complicaciones que se asocian a los stents metálicos en la vía aérea. Con objeto de simplificar el planteamiento del problema, hemos diseñado cultivos *in vitro* que nos permiten controlar la mayoría de las condiciones experimentales, como composición de los materiales y medios de cultivo implicados, descartando otros procesos exógenos como reclutamiento de células sanguíneas o aporte de sustancias ajenas al medio de cultivo. Por otro lado, sería de esperar que en la superficie metálica

de los stents se produzcan cambios químicos, especialmente después de un largo contacto con el medio de cultivo, y ello podría conducir a la posible liberación de algunos de los elementos metálicos que componen el stent debido a procesos de lixiviación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de stents para co-cultivos *in vitro* con células epiteliales respiratorias y fibroblastos: por su distinta composición, y por el tipo de droga que liberan en el caso de los DES (*"drug-eluting stents"*), se eligieron los siguientes stents, todos ellos disponibles comercialmente y autorizados para su uso en humanos:

- Nitinol desnudo (Zilver Flex®, Cook Medical, Bjaeversnov, Dinamarca), constituido por una aleación de níquel y titanio, con memoria de forma al ser desplegado.
- Nitinol recubierto de paclitaxel (Zilver PTX®, Cook Medical), similar al anterior en cuanto a su composición metálica, pero con incorporación en su superficie de paclitaxel, a dosis de 3 µg/mm² y patrón de liberación relativamente rápida.
- Aleación de cromo-cobalto (Wallstent®, Boston Scientific, Natick, MA, USA).

Investigación de la composición de los stents usados en el estudio: se realizó en tres centros independientes, el Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla, el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura y en la Universidad de Zaragoza. Para el análisis de superficie se usaron técnicas de Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS) usando un analizador VG-ESCALAB100. Se realizaron medidas de la superficie de los stents con el fin de confirmar la composición elemental superficial de los mismos. Para ello se realizaron medidas de superficies de los distintos tipos de stents tras su extracción de su envase original y después de un desbastado por bombardeo iónico (*etching*) de varios minutos cuya finalidad era limpiar su superficie de posibles impurezas. Para determinar de qué componentes está fabricado cada stent se realizó un experimento en el que a la superficie se le aplicó un *etching* intensivo, y se determinaron los espectros en cuatro puntos diferentes de la muestra.

En el caso del stent Zilver PTX se requirieron dos bombardeos con Argon (durante un tiempo total de 90 segundos) para conseguir sobrepasar la gruesa capa orgánica que recubría el stent metálico. En este caso se usó también microscopio electrónico de barrido (*SEM*) y técnica EDX (*Energy-*

dispersive X-ray spectroscopy) -que es capaz de penetrar hasta 1 µm- y los resultados fueron similares a los obtenidos mediante XPS.

Preparación de los stents para co-cultivo con las líneas celulares: cada uno de los stents se extrajo de su envase original y se desplegó (siguiendo las instrucciones del fabricante) en condiciones estériles (dentro de una campana de flujo laminar), y a continuación se cortó en fragmentos para adaptarlos a los pocillos de cultivo (de 21 mm de diámetro). Una vez alojados los fragmentos en el fondo del pocillo y convenientemente fijados con un anillo de material sintético resistente a ácidos y a condiciones extremas de temperatura, se añadió a los pocillos el medio de cultivo y un total de 50.000 células de cada una de las dos líneas seleccionadas para el presente estudio.

Cultivo celular: La línea MRC-5 (fibroblastos respiratorios de origen humano) se obtuvo de la *European Collection of Cell Culture* (ECACC, Salisbury, UK), y la línea CRL-4011 (células epiteliales respiratorias de origen humano) se adquirió de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA). MRC-5 y CRL-4011 se cultivaron siguiendo las recomendaciones especificadas por las entidades proveedoras de estas líneas celulares. Las células se sembraron en pocillos de 3,3 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca), se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y se co-cultivaron con cada stent durante 21 días. Las células cultivadas sin stent sirvieron como control, y cada experimento se repitió seis veces. El medio de cultivo se reemplazó cada tres días, y los sobrenadantes se recogieron, alicuotaron y se almacenaron a -80° C. Los cambios morfológicos celulares se examinaron con microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 25; Carl Zeiss Co., Oberkochen, Alemania). La viabilidad celular se determinó mediante exclusión de azul trypan (Sigma-Aldrich, GmbH, Munich, Alemania).

Investigación de elementos en sobrenadantes de co-cultivos celulares con stents metálicos: se investigó la posible liberación de elementos metálicos en el medio de cultivo tras co-cultivar los stents (Wallstent®, Zilver Flex® y Zilver PTX®) con las líneas CRL 4011 (células epiteliales respiratorias) y MRC-5 (fibroblastos) en los siguientes puntos de tiempo: 3, 9, 15 y 21 días, y también se ha analizado la posible presencia de esos mismos elementos en el medio de cultivo original (antes de añadirlo a los cultivos celulares). Estas investigaciones han sido llevadas a cabo en el laboratorio ICP/MS-L 170 del Servicio Interdepartamental (Sidi) de la Universidad Autónoma de Madrid.

Investigación de eventuales modificaciones de los stents metálicos tras co-cultivos: se realizó en el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura, y para completarlo se requirió bombardeo con Argón (*etching*) con objeto de poder llegar hasta el núcleo metálico de la aleación constitutiva del stent.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se usaron los siguientes tests:

- Prueba T pareada para comparar los niveles de elementos en sobrenadantes de co-cultivos de los diferentes stents con células epiteliales y fibroblastos en cada punto de tiempo y sus correspondientes controles. Cuando no se cumplió el test de Levene (igualdad de varianzas), se usaron los siguientes tests no paramétricos:
- Test de Wilcoxon para análisis de medidas repetidas dentro de los grupos.
- Test de Kruskal-Wallis para análisis de diferencias entre grupos, tomando como variable de agrupación el cultivo control y los diferentes tipos de stents usados en los experimentos (=variables independientes), y como variables de contraste los niveles de elementos metálicos.

Se rechaza la hipótesis nula cuando $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se usó el paquete SPSS versión 20, SPSS IBM Corporation, Somers, NY, USA).

RESULTADOS

Composición de los stents usados en el estudio:

- Wallstent®: Cobalto = 47%, Níquel = 20%, Cromo = 20%, Molibdeno = 7%, Manganeso = 2%, trazas de Hierro y capa orgánica constituida por Carbono y Oxígeno. Zilver Flex® (nitinol): Níquel = 58%, Titanio = 34% (en forma de TiO₂), más capa orgánica.
- Zilver PTX® (nitinol + paclitaxel): La composición metálica obtenida fue la siguiente: Níquel = 15%, Titanio = 10%, y en la superficie se detectaron Carbono, Oxígeno, Flúor y Nitrógeno principalmente, como componentes de la gruesa capa orgánica que lo recubría.

Investigación de elementos en sobrenadantes de co-cultivos celulares con stents metálicos: tras un análisis semicuantitativo explorando la posible presencia de 28 elementos, se optó por analizar específicamente la concentración (en microgramos/Litro) de Titanio, Cromo, Níquel, Cobalto y Molibdeno, que se encuentran en la composición de los stents implicados en nuestros experimentos.

En la Tabla 1 se expone la concentración de elementos medida en los medios de cultivo usados para los experimentos con la línea celular CRL 4011 (epitelial) y la MRC5 (fibroblastos) y se puede observar que el medio de las células epiteliales es en general más rico en aquellos elementos, con la excepción del hierro, cuya concentración es más alta en el medio usado para el cultivo de fibroblastos.

Análisis cuantitativo en sobrenadantes de co-cultivos de stents con CRL 4011 (células epiteliales): en todos los experimentos con células epiteliales se observaron mayores niveles de elementos metálicos en los sobrenadantes recogidos tres días después de la puesta en marcha del cultivo. Los sobrenadantes de los cultivos con Wallstent muestran los niveles más altos de níquel y cobalto en el tercer día de cultivo. Por otro lado, los niveles de titanio fueron más altos en el tercer día de cultivo de Zilver Flex y PTX, que están constituidos por una aleación de níquel y titanio (nitinol) (figura 1A).

Wallstent (aleación basada en cromo-cobalto): los niveles de Cobalto, Níquel y Molibdeno en los sobrenadantes recogidos el día 3 del co-cultivo de Wallstent con células epiteliales (fueron significativamente más altos que en los sucesivos puntos de tiempo (9, 15 y 21 días) ($p < 0,003$), y muy superiores a los del cultivo control (Cobalto el día 3: 31,41 $\mu\text{g/L}$ vs. 18,3 $\mu\text{g/L}$, Níquel el día 3: 10,42 $\mu\text{g/L}$ vs. 1,82 $\mu\text{g/L}$, Molibdeno el día 3: 4,95 $\mu\text{g/L}$ vs. 2,26 $\mu\text{g/L}$) ($p = 0,001$) (figura 2A).

Zilver PTX (aleación de níquel y titanio, nitinol, con liberación de paclitaxel): los niveles de Titanio y Níquel en los sobrenadantes recogidos el día 3 del co-cultivo con células epiteliales fueron significativamente más altos que en los puntos posteriores de tiempo (9, 15 y 21 días) ($p < 0,002$), y muy superiores a los del cultivo control (Titanio el día 3: 14,6 $\mu\text{g/L}$ vs. 5,79 $\mu\text{g/L}$, Níquel el día 3: 6,89 $\mu\text{g/L}$ vs. 1,82 $\mu\text{g/L}$) ($p < 0,001$) (figura 3A).

Zilver Flex (aleación de níquel y titanio, nitinol): los niveles de Titanio y Níquel en los sobrenadantes recogidos el día 3 del co-cultivo con células epiteliales fueron significativamente más altos que en los puntos posteriores de tiempo (9, 15 y 21 días) ($p < 0,006$), y muy superiores a los del cultivo control (Titanio el día 3: 14,86 $\mu\text{g/L}$ vs. 5,79 $\mu\text{g/L}$, Níquel el día 3: 16,91 $\mu\text{g/L}$ vs. 1,82 $\mu\text{g/L}$) ($p = 0,001$) (figura 3A).

Análisis cuantitativo en sobrenadantes de co-cultivos de stents con MRC5 (fibroblastos): lo más llamativo son los niveles de níquel liberados por el Zilver Flex en los días 3 y 21 del cultivo con fibroblastos. Como ocurrió con el co-cultivo de células epiteliales con

Wallstent, los niveles de cobalto en el día 3 de cultivo de este stent son marcadamente altos. También son importantes los niveles de titanio medidos en los sobrenadantes recogidos el tercer día de co-cultivo de Zilver Flex y PTX con fibroblastos (figura 1B).

Wallstent: en el co-cultivo de Wallstent con fibroblastos se observaron parámetros muy similares a las células epiteliales, aunque con niveles ligeramente inferiores a éstas: Los niveles de Cobalto, Níquel y Molibdeno en los sobrenadantes recogidos el día 3 del co-cultivo de Wallstent con fibroblastos fueron significativamente más altos que en los puntos posteriores de tiempo (9, 15 y 21 días) ($p < 0,007$), y muy superiores a los del cultivo control (Cobalto el día 3: 25,73 $\mu\text{g/L}$ vs. 0,12 $\mu\text{g/L}$, Níquel el día 3: 17,59 $\mu\text{g/L}$ vs. 6,89 $\mu\text{g/L}$, Molibdeno el día 3: 7,17 $\mu\text{g/L}$ vs. 4,23 $\mu\text{g/L}$) ($p = 0,005$) (figura 2B).

Zilver PTX: los niveles de Titanio y Níquel en los sobrenadantes recogidos el día 3 del co-cultivo con fibroblastos fueron significativamente mayores que en los puntos de tiempo posteriores (9, 15 y 21 días) ($p < 0,015$), y muy superiores a los del cultivo control (Titanio el día 3: 11,99 $\mu\text{g/L}$ vs. 4,79 $\mu\text{g/L}$, Níquel el día 3: 22,28 $\mu\text{g/L}$ vs. 6,89 $\mu\text{g/L}$) ($p = 0,002$) (figura 3B).

Zilver Flex: Los niveles de Titanio y Níquel en los sobrenadantes recogidos el día 3 del co-cultivo con fibroblastos fueron significativamente más altos que en el día 9 ($p = 0,006$), y el día 15 ($p = 0,014$) y muy superiores a los del cultivo control (Titanio el día 3: 12,94 $\mu\text{g/L}$ vs. 4,79 $\mu\text{g/L}$, Níquel el día 3: 23,54 $\mu\text{g/L}$ vs. 6,89 $\mu\text{g/L}$) ($p = 0,001$). Con sólo una excepción (niveles de níquel en sobrenadante del co-cultivo de Zilver Flex® con fibroblastos en el día 21), en todos los casos se registraron los niveles más elevados en el tercer día de cultivo (figura 3B).

Relación de resultados obtenidos en sobrenadantes de co-cultivos respecto a los cultivos control (con el mismo tipo de línea celular, CRL-4011, pero sin stents): los resultados más relevantes se obtuvieron en todos los casos en los primeros días de cultivo (concretamente el día 3°). Se observaron niveles muy elevados de cobalto, níquel y molibdeno en los sobrenadantes del co-cultivo con Wallstent (figura 2).

Se debe también resaltar la presencia de un exceso de titanio y níquel en los sobrenadantes de co-cultivos de células epiteliales con stents que contienen estos dos elementos como constitutivos esenciales de su composición. Este exceso de Ti y Ni sobrepasa los límites de tolerancia de la técnica de medición, y por consiguiente implica una clara liberación desde los stents constituidos por aleación de níquel y titanio (*nitinol*): PTX® (nitinol con

polímero liberador de paclitaxel), y Zilver Flex® (nitinol sin droga) (figura 3). En la figura 4 (paneles A-E) se presentan las proporciones (= cocientes) de los niveles medidos en cada stent respecto a los controles en sus correspondientes puntos de tiempo.

Investigación de eventuales modificaciones de los stents metálicos tras co-cultivos con líneas celulares respiratorias: nuestros estudios muestran que los stents metálicos investigados se revisten de una capa orgánica tras su exposición al cultivo celular, y que requirieron bombardeo con Argon (*etching*) para llegar hasta el núcleo metálico de la aleación constitutiva del stent. Por razones obvias, esta capa orgánica era más gruesa en los stents revestidos originalmente de un polímero liberador de paclitaxel (PTX). Por causas técnicas no fue posible estudiar los stents después del cultivo con células epiteliales.

Wallstent

Análisis pre-cultivo: se investigaron espectros en 22 puntos del Wallstent. Los elementos principales en todos ellos fueron **Carbono, Oxígeno y Cromo**. No se observan en ningún caso picos relacionados con elementos de sales inorgánicas (sodio, potasio, cloro o fósforo). Se realizó un *etching* intenso sobre la muestra, y los elementos que se detectan son **Cobalto, Cromo, Níquel, Molibdeno, Hierro, Oxígeno y Carbono**.

Análisis post-cultivo con fibroblastos: la capa superficial de la muestra es un material orgánico de naturaleza no conductora. En los 12 puntos que se investigaron se detectó **carbono, oxígeno y nitrógeno**. También en pequeñas cantidades había elementos de las sales del medio de cultivo (sodio, cloro y fósforo), y en uno de los puntos fue posible visualizar el **cromo** de la aleación. En conclusión, el Wallstent es una aleación de cobalto, cromo, níquel, molibdeno y hierro, y se encuentra recubierto por una capa orgánica compuesta por carbono y oxígeno principalmente.

Stent Zilver Flex (antes del cultivo)

Experimento con *etching*: los resultados indican que el stent es una aleación de **titanio y níquel (nitinol)**. La presencia de **oxígeno** indica que parte de los metales se encuentran formando óxidos (óxido de titanio). Se analizaron 21 puntos de la muestra, y en todos ellos se detectó **Carbono, Oxígeno y Nitrógeno** con una proporción muy estable, y esto da idea de la homogeneidad de este recubrimiento sobre toda la muestra. También se observó un pico de **Titanio** (es lo único que se ve de la aleación de que está compuesta el stent), posiblemente en estado oxidado (TiO_2).

Stent Zilver Flex después del cultivo con fibroblastos.

Se analizaron 22 puntos de la muestra, y en todos ellos se detectó **Carbono, Oxígeno, Sodio, Cloro, Nitrógeno, Fosforo y Titanio**, y es claro que el stent está cubierto por restos del medio de cultivo.

Stent Zilver PTX antes y después del cultivo con fibroblastos.

Se tuvieron que hacer dos *etchings* para tratar de eliminar la capa orgánica que recubría la muestra. Aun así, esa capa no se consiguió eliminar completamente por ser más gruesa que la de los stents Zilver Flex y Wallstent, sobre todo en los extremos. Los resultados indican que el stent es una aleación de **Níquel y Titanio (nitinol)**. Los estudios post-cultivo fueron similares a los del Zilver Flex.

ELEMENTO	Células epiteliales		Fibroblastos		
	Media (µg/L)	I.C. 95%	Media (µg/L)	I.C. 95%	
⁴⁷ Ti	8,24	6,5 – 9,98	4,83	3,09 - 6,57	p = 0,004
⁵² Cr	2,7	2,48 – 2,92	0,81	0,66 – 0,96	p < 0,001
⁵⁶ Fe	89,74	85,02 – 94,46	195,54	190,8 – 200,3	p < 0,001
⁵⁸ Ni	12,61	8,09 – 17,13	0,61	0,36 – 0,86	p < 0,007
⁵⁹ Co	38,99	37 – 39,98	0,11	0,06 – 0,16	p < 0,001
⁹⁸ Mo	8,21	7,81 – 8,61	3,18	2,88 – 3,48	p < 0,001

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo usados para células epiteliales y fibroblastos. I.C. 95% = Intervalo de confianza 95%.

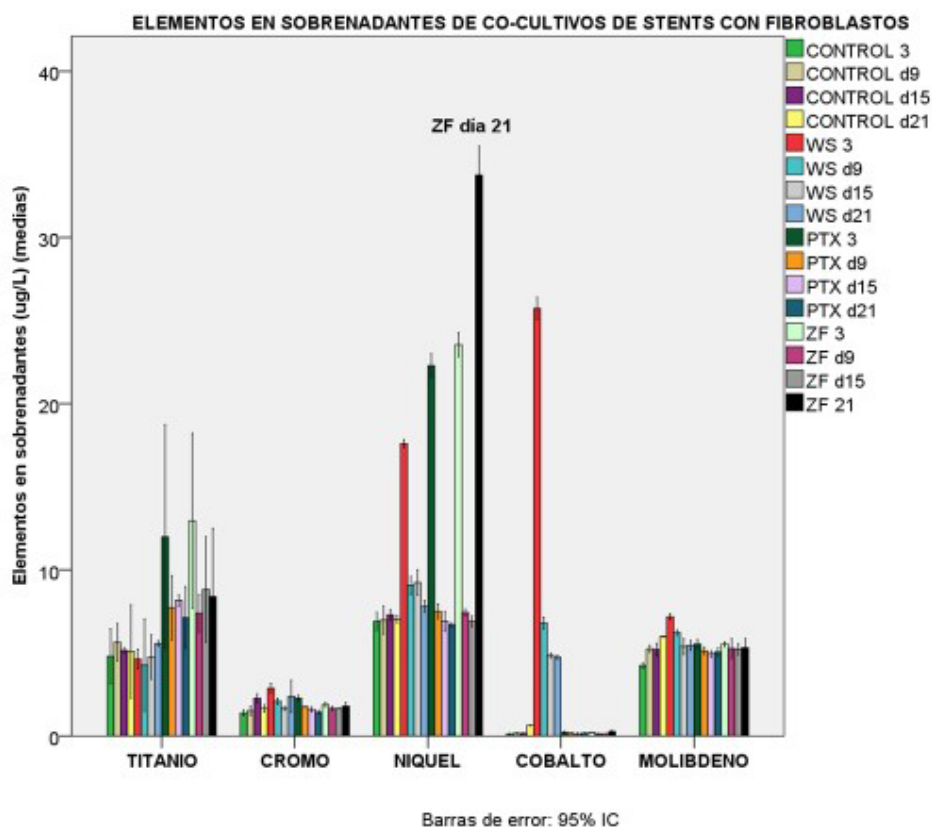


Figura 1 (Panel A)

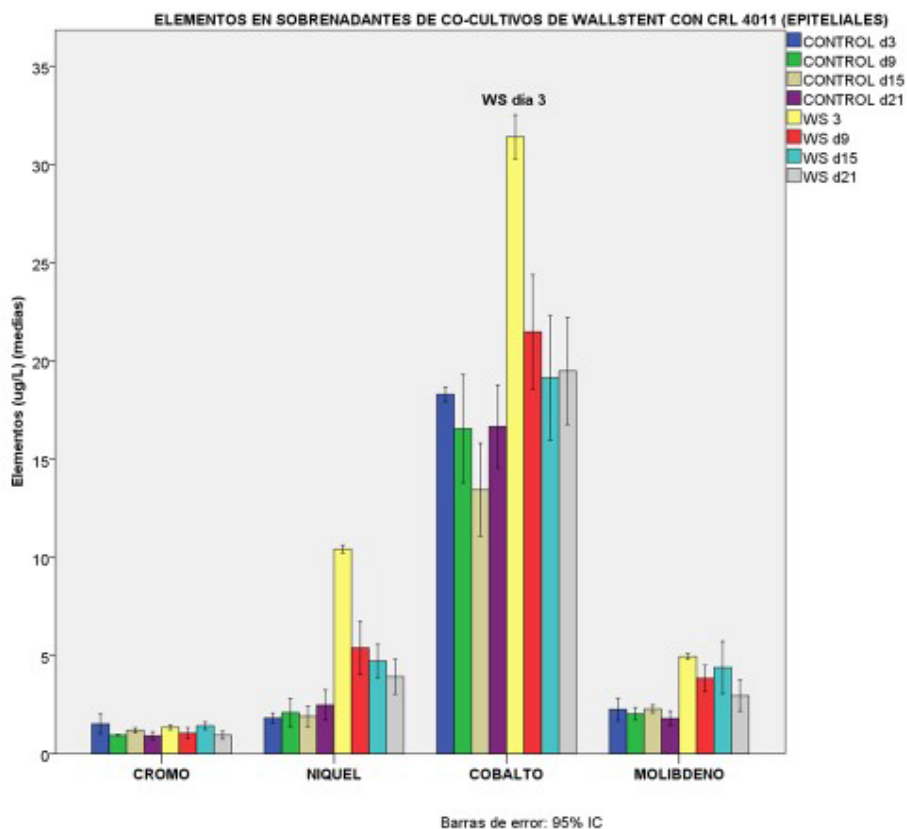


Figura 1 (Panel B)

Figura 1. Niveles de elementos medidos en los sobrenadantes de co-cultivos de stents con células epiteliales (Panel A) y fibroblastos (Panel B).

CONTROL d3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos sin stent. CONTROL d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos sin stent. CONTROL d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos sin stent. CONTROL d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos sin stent.

WS3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos con Wallstent.

WS d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos con Wallstent.

WS d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos con Wallstent.

WS d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos con Wallstent.

PTX3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos con Zilver PTX.

PTX d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos con Zilver PTX.

PTX d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos con Zilver PTX.

PTX d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos con Zilver PTX.

ZF3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos con Zilver Flex.

ZF d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos con Zilver Flex.

ZF d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos con Zilver Flex.

ZF d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos con Zilver Flex.

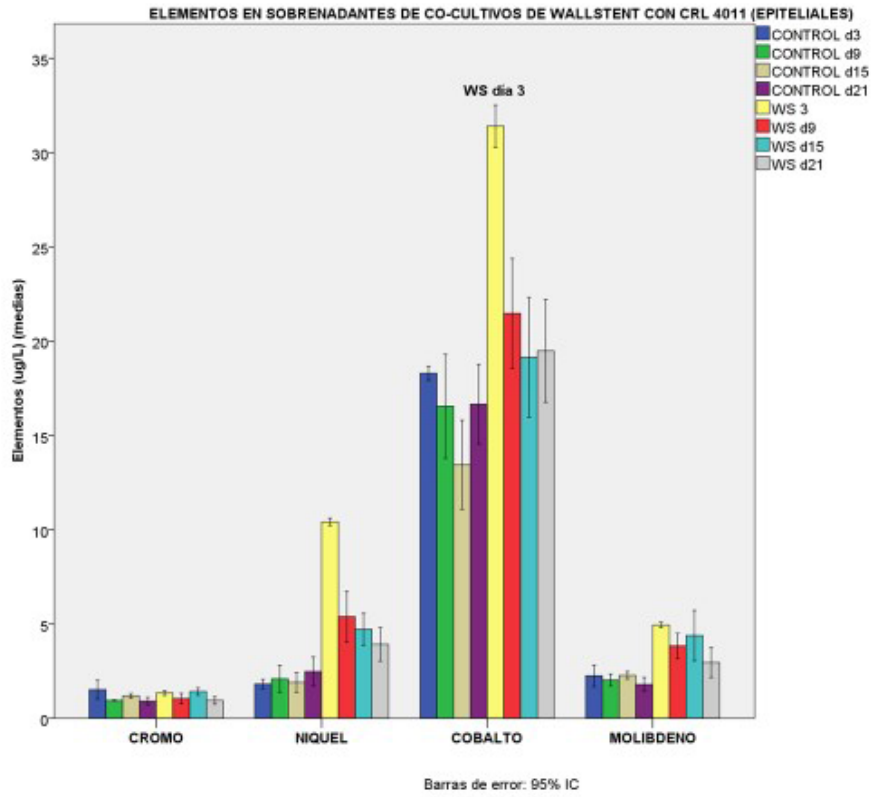


Figura 2 (Panel A)

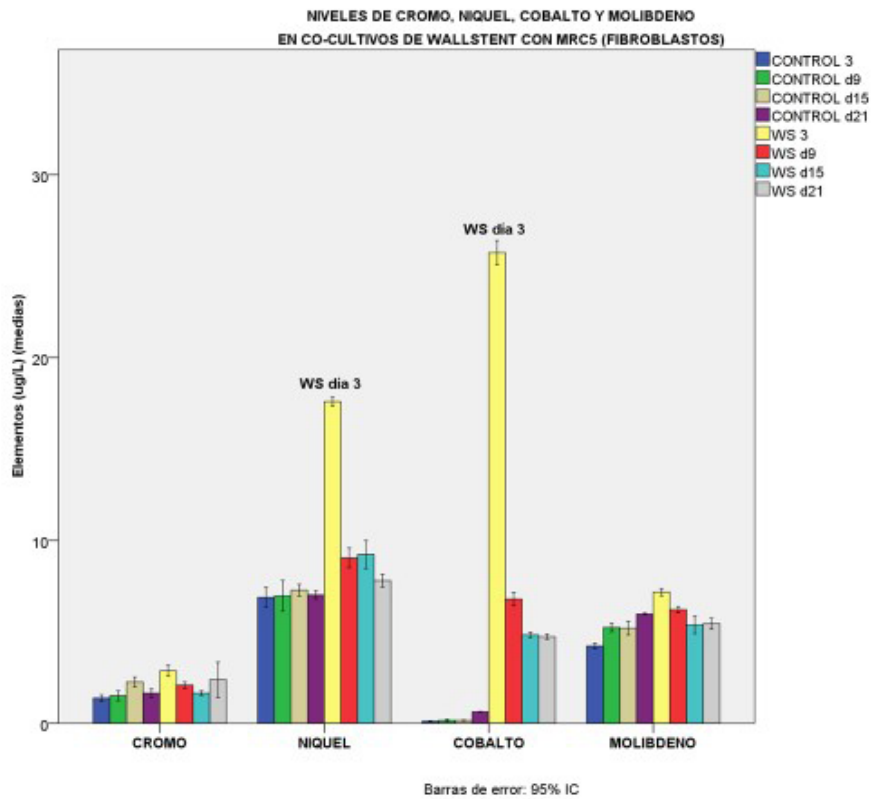


Figura 2 (Panel B)

Figura 2. Niveles de elementos medidos en los sobrenadantes de co-cultivos de Wallstent con células epiteliales (Panel A) y fibroblastos (Panel B).

CONTROL d3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos sin stent. CONTROL d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos sin stent. CONTROL d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos sin stent. CONTROL d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos sin stent.

WS3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos con Wallstent.

WS d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos con Wallstent.

WS d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos con Wallstent.

WS d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos con Wallstent.

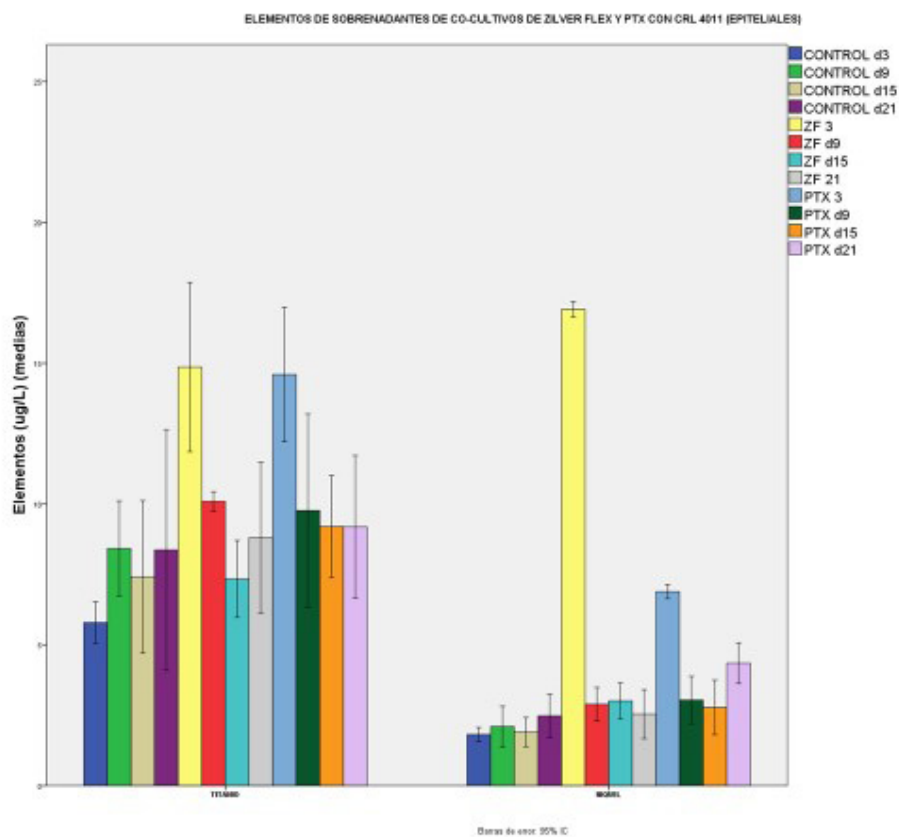


Figura 3 (Panel A)

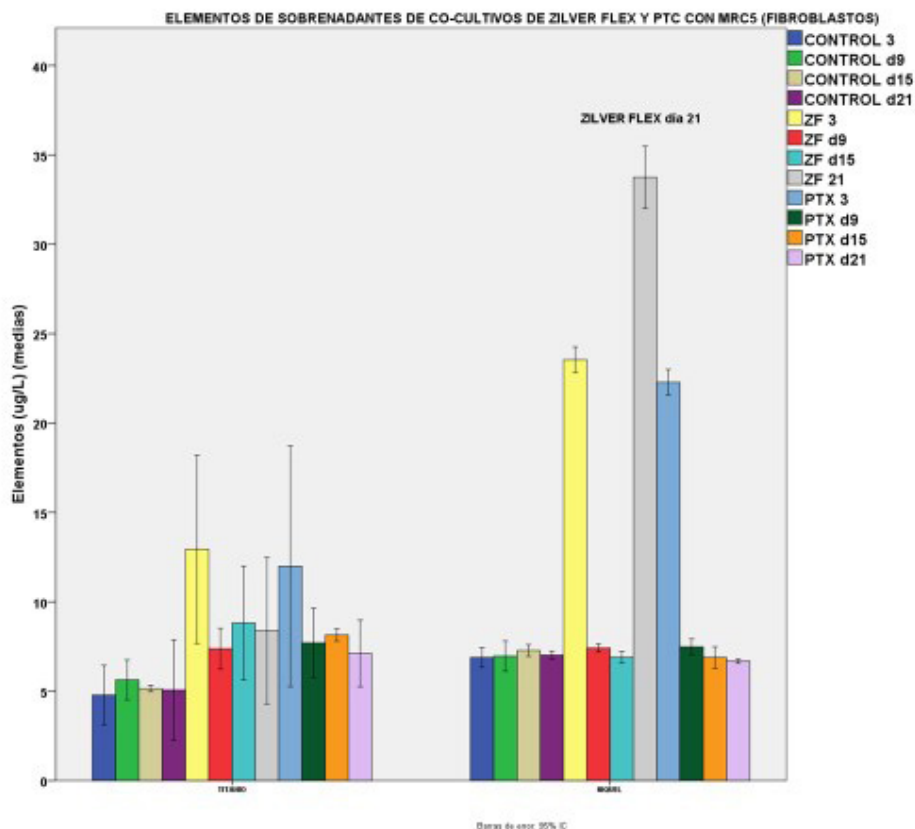


Figura 3 (Panel B)

Figura 3. Niveles de elementos medidos en los sobrenadantes de co-cultivos de Zilver Flex y PTX con células epiteliales (Panel A) y fibroblastos (Panel B).

CONTROL d3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos sin stent. CONTROL d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos sin stent. CONTROL d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos sin stent. CONTROL d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos sin stent.

ZF3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos con Zilver Flex.

ZF d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos con Zilver Flex.

ZF d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos con Zilver Flex.

ZF d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos con Zilver Flex.

PTX3 = Sobrenadantes recogidos el día 3 de los cultivos con Zilver

PTX. PTX d9 = Sobrenadantes recogidos el día 9 de los cultivos con Zilver PTX.

PTX d15 = Sobrenadantes recogidos el día 15 de los cultivos con Zilver PTX.

PTX d21 = Sobrenadantes recogidos el día 21 de los cultivos con Zilver PTX.

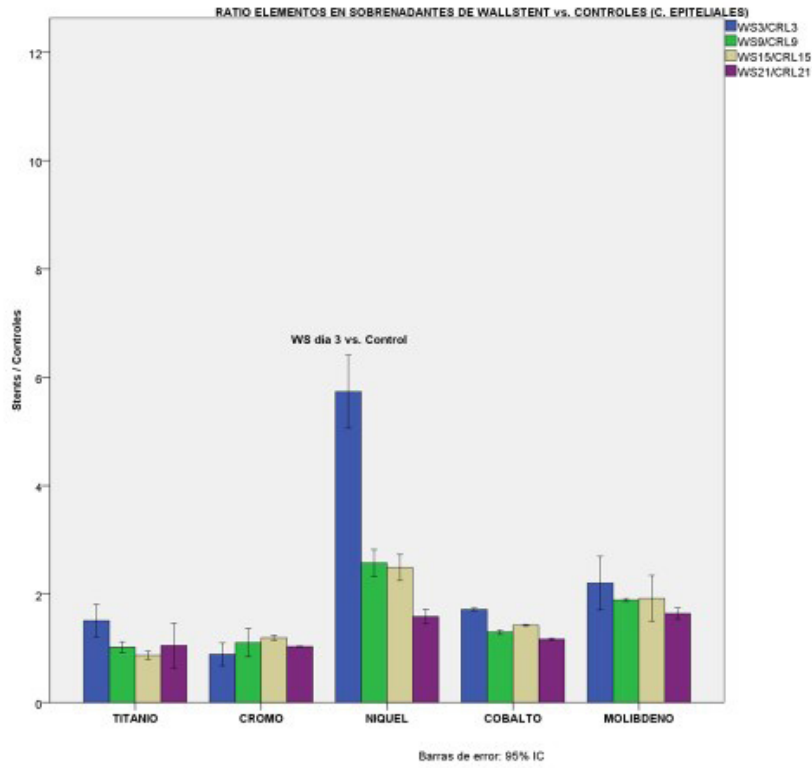


Figura 4 (Panel A)

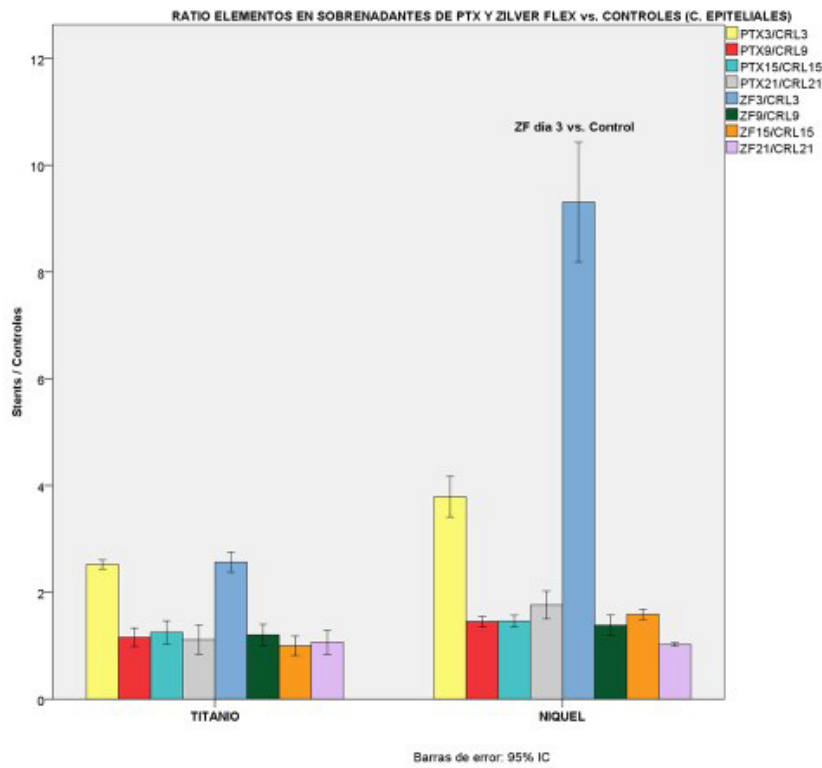


Figura 4 (Panel B)

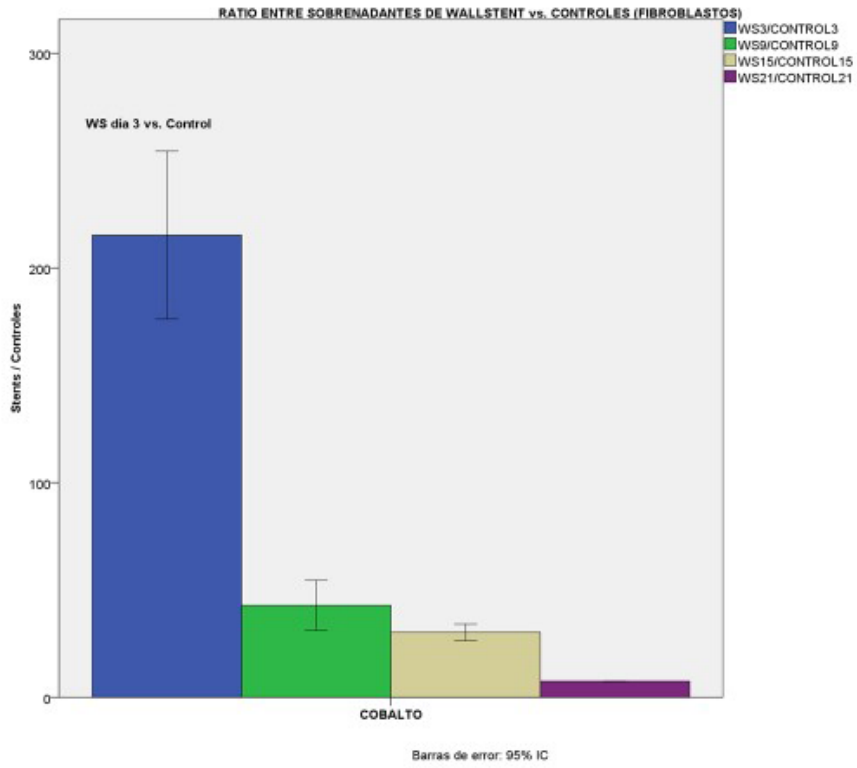


Figura 4 (Panel C)

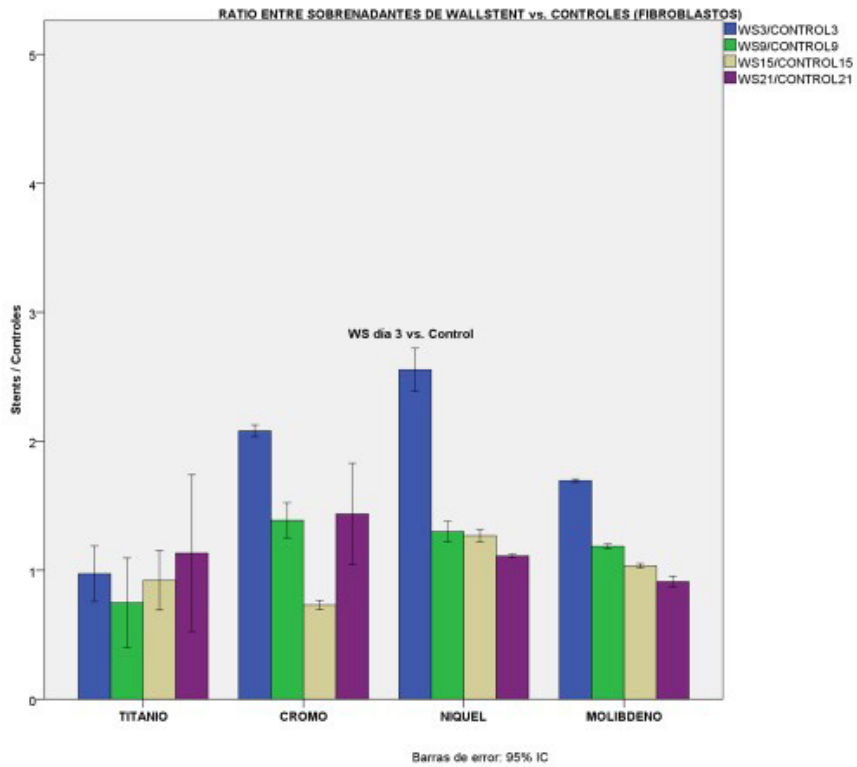


Figura 4 (Panel D)

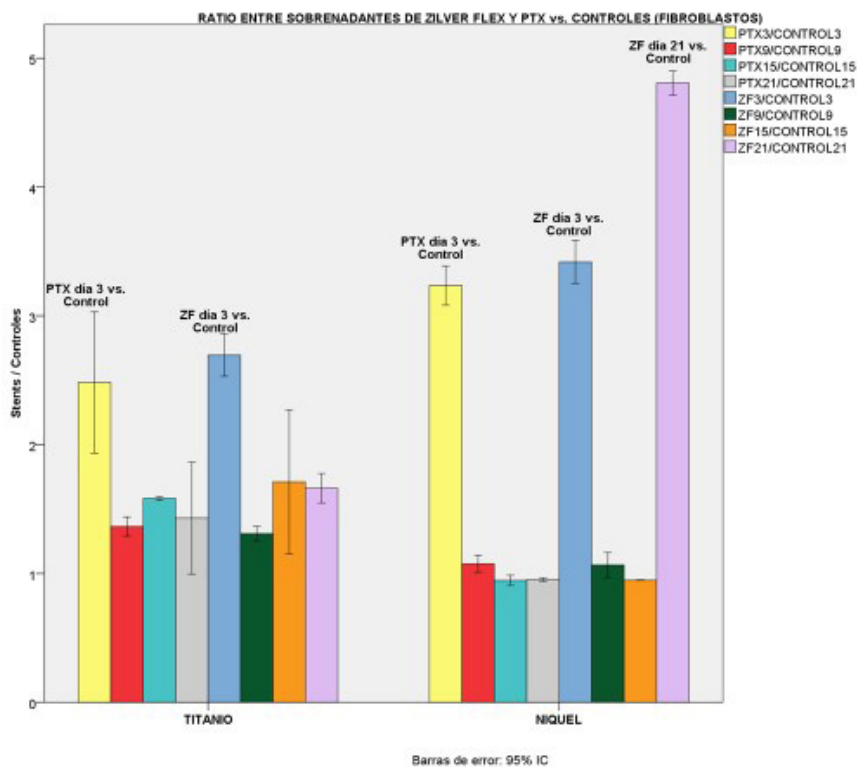


Figura 4 (Panel E)

Figura 4. Relación de los elementos detectados en los sobrenadantes de los co-cultivos de stents con las células epiteliales (Paneles A, B) y fibroblastos (Paneles C, D, E) respecto a los Controles. Las barras indican el porcentaje en que los sobrenadantes de los stents superan a los correspondientes controles.

WS3/CRL3 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Wallstent recogidos el día 3 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 3.

WS9/CRL9 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Wallstent recogidos el día 9 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 9.

WS15/CRL15 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Wallstent recogidos el día 15 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 15.

WS21/CRL21 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Wallstent recogidos el día 21 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 21.

PTX3/CRL3 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver PTX recogidos el día 3 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 3.

PTX9/CRL9 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver PTX recogidos el día 9 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 9.

PTX15/CRL15 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver PTX recogidos el día 15 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 15.

PTX21/CRL21 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver PTX recogidos el día 21 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 21.

ZF3/CRL3 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver Flex recogidos el día 3 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 3.

ZF9/CRL9 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver Flex recogidos el día 9 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 9.

ZF15/CRL15 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver Flex recogidos el día 15 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 15.

ZF21/CRL21 = Cociente entre los niveles medidos en los sobrenadantes del co-cultivo de Zilver Flex recogidos el día 21 y los sobrenadantes de los cultivos control recogidos el día 21.

DISCUSIÓN

En experimentos similares realizados hace varios años por nuestro grupo habíamos observado claras diferencias en el patrón de crecimiento y en la morfología celular cuando se comparaban los cultivos con y sin presencia de stents, y especulamos que muy posiblemente guardaban relación con la lixiviación en el medio de cultivo de elementos metálicos procedentes de los stents. Los resultados del presente estudio vienen a confirmar nuestras sospechas, ya que hemos detectado una rápida liberación en el sobrenadante de los cultivos -tanto con células epiteliales como con fibroblastos- de los elementos constitutivos de los tres stents que incluimos en los experimentos. Sorprendentemente, y con sólo una excepción (niveles de níquel en sobrenadante del co-cultivo de Zilver Flex® con fibroblastos en el día 21), en todos los casos se registraron los niveles más elevados *en el tercer día de cultivo*. El hallazgo de una capa orgánica homogénea cubriendo los stents analizados después de los cultivos podría sugerir un cierto papel protector de esa capa contra la prolongada liberación de los elementos metálicos del stent en las fases avanzadas de nuestros experimentos *in vitro*.

Consideramos que los aspectos claves de nuestra investigación se centran en las posibles diferencias entre los co-cultivos con stents y los cultivos control (*figuras 1-4*).

A la vista de nuestros resultados, es claro que el co-cultivo de Wallstent® (constituído básicamente por Cobalto, Cromo, Níquel y Molibdeno) con ambas líneas celulares, *pero sobre todo con fibroblastos*, provoca una marcada liberación de todos sus componentes -especialmente Cobalto y Níquel- en los primeros días del cultivo, y ello podría inducir marcados efectos sobre cito-toxicidad y/o proliferación celular.

Tanto el stent Zilver Flex® como el Zilver PTX® liberan importantes cantidades de sus dos componentes (Níquel y Titanio) en los sobrenadantes de cultivos con células epiteliales y fibroblastos, sobre todo en los primeros días. El hallazgo en nuestro estudio de niveles muy elevados de Níquel el día 21 de co-cultivo de Zilver Flex® con fibroblastos (*figura 3B*) sugiere una fuerte interacción de los fibroblastos con la estructura metálica del stent, que alcanza su pico máximo en la fase final de los experimentos. En un estudio previo de nuestro grupo registramos una densa proliferación de fibroblastos alrededor de los filamentos del stent en los últimos días del cultivo y, en concordancia con este hallazgo, los niveles de TGFβ1 detectados en los sobrenadantes de cultivo

de Zilver Flex® fueron superiores a todos los demás stents en esa fase final, y también fueron los más altos producidos por este stent en todos sus puntos de tiempo de cultivo⁵.

La elevada liberación de níquel en los co-cultivos de todos los stents con cualquiera de las dos líneas celulares con las que hemos trabajado es muy relevante y, aunque no hemos investigado directamente este aspecto en el presente trabajo, probablemente esa liberación haya provocado algunos efectos nocivos. De hecho, en nuestro estudio mencionado previamente encontramos alta producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8) en los sobrenadantes recogidos el tercer día de co-cultivo de esos mismos stents con fibroblastos, y la viabilidad celular cayó drásticamente a lo largo de los experimentos *in vitro*⁵. En otro estudio que realizamos *in vivo* en conejos a los que se implantaron estos mismos tipos de stent encontramos que también se detectaban altos niveles de expresión de IL-8 (*mRNA*) en los lavados traqueales y en la sangre de esos animales, y que su detección precoz en sangre periférica en los primeros días de los experimentos se correlacionaba con un mayor índice de complicaciones⁶.

Se ha demostrado que la exposición a níquel provoca una amplia variedad de efectos adversos en las vías respiratorias, alterando la integridad de la barrera epitelial e induciendo stress oxidativo⁷. Además, el níquel es alergénico⁸, puede ser carcinógeno en humanos⁹, e induce una marcada inflamación tisular que se ha asociado a su liberación desde implantes *in vivo*¹⁰.

Los elevadísimos *niveles de Cobalto* en los sobrenadantes del co-cultivo de Wallstent® con fibroblastos en el tercer día de nuestros experimentos (más de 200 veces sobre el control, *figura 4C*) constituyen uno de los hallazgos más notables y sorprendentes en el presente estudio, y muy probablemente guardan alguna relación con la observación de un alto índice de complicaciones traqueales asociadas con este stent en las primeras semanas de nuestro estudio *in vivo* mencionado más arriba⁶. En experimentos realizados en ratas, la inhalación de cobalto provocó una clara producción de hiperplasia y metaplasia escamosa en el epitelio respiratorio¹¹, y también se observaron este mismo tipo de alteraciones en un reciente estudio realizado en conejos en los que se implantó Wallstent® en la tráquea¹². Es importante señalar que, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado una interacción entre cromo, cobalto y níquel, que -como ya ha quedado establecido- son elementos constitutivos del Wallstent®.

La presencia de cobalto en disolución -como ocurre en nuestros experimentos- se ha asociado a daños directos sobre el ADN por mecanismos oxidativos (formación de ROS, *reactive oxygen species*) y a problemas con la reparación de esos daños¹³. Los iones de cobalto y cromo pueden también desplazar a otros metales en la estructura de muchas proteínas, provocando un serio deterioro en su función. Por otro lado, la acumulación y retención de cobalto en los tejidos puede ser muy alta y persistente, y en los hematíes se considera irreversible¹⁴, por lo que -si se confirma la alta tasa de liberación de cobalto desde los stents en estudios *in vivo*- este problema reviste especial gravedad. De hecho, se han descrito complicaciones (daño tisular, necrosis e inflamación) asociadas a reacciones locales adversas frente a cromo y cobalto *in vivo* en pacientes portadores de prótesis de cadera¹⁵, y también se han detectado daños de ADN en la mucosa bucal de pacientes con implantes metálicos en ortodoncia¹⁶.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones, y la principal podría radicar en su naturaleza puramente experimental *in vitro*, porque los cultivos constituyen un sistema cerrado que no permite el reclutamiento de nuevas células o la provisión -con las consiguientes interacciones- de cualquier otro factor distinto de los contenidos en el medio de cultivo, por lo que nuestros resultados han de interpretarse con cautela. No obstante, este mismo sistema cerrado nos permite analizar con más detalle -y sin interferencias externas- algunos aspectos ligados específicamente a la distinta composición de los diversos stents, lo que simplifica notablemente la investigación de este importante problema.

Como conclusión, y a pesar de sus limitaciones, nuestro estudio demuestra una intensa liberación de elementos metálicos constitutivos de los stents hacia el medio de cultivo en que se encuentran inmersos. Además, esta preocupante liberación ocurre muy rápidamente en los primeros días de cultivo con células epiteliales respiratorias y fibroblastos. Será necesario demostrar en el futuro que también esta liberación ocurre en experimentos animales *in vivo*. Si las sospechas se confirman, será necesario adoptar en el futuro las debidas precauciones en la práctica clínica en humanos, evitando en la medida de lo posible el uso de stents metálicos en cualquier situación. Es posible que éstos puedan ser sustituidos por stents biológicos, con composición y características de reabsorción gradual previamente programadas, según las necesidades del paciente en cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

1. McLucas E, Rochev Y, Carroll W, Met al. Analysis of the effects of surface treatments on nickel release from nitinol wires and their impact on candidate gene expression in endothelial cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Mar; 19(3): 975-80.
2. Shabalovskaya SA, Tian H, Anderegg J, Wet al. The influence of surface oxides on the distribution and release of nickel from Nitinol wires. *Biomaterials*. 2009 Feb; 30(4): 468-77.
3. Tian H, Schryvers D, Liu Det al. Stability of Ni in nitinol oxide surfaces. *Acta Biomater*. 2011 Feb; 7(2): 892-9.
4. Pulletikurthi C, Munroe N, Gill P et al. Cytotoxicity of Ni from Surface-Treated Porous Nitinol (PNT) on Osteoblast Cells. *J Mater Eng Perform*. 2011 Jul 1; 20(4-5): 824-9.
5. Arellano Orden E, Montes Worboys A, Sáenz Coronilla FJ et al. Interacciones entre stents metálicos desnudos y liberadores de droga con fibroblastos respiratorios co-cultivados *in vitro*. *Rev Esp Patol Torac* 2013; 25(4): 235-47.
6. Arellano-Orden E, Serrano C, Montes-Worboys A et al. Stent-induced tracheal stenosis can be predicted by IL-8 expression in rabbits. *Eur J Clin Invest*. 2017 Jan; 47(1): 84-92.
7. Forti E, Salovaara S, Cetin Y et al. In vitro evaluation of the toxicity induced by nickel soluble and particulate forms in human airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2011 Mar; 25(2): 454- 61.
8. Saito M, Arakaki R, Yamada A, et al. Molecular Mechanisms of Nickel Allergy. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb 2; 17(2). pii: E202.
9. Yao Y, Costa M. Toxicogenomic effect of nickel and beyond. *Arch Toxicol*. 2014 Sep; 88(9): 1645-50.
10. Wataha JC, O'Dell NL, Singh BB et al. Relating nickel-induced tissue inflammation to nickel release *in vivo*. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58(5): 537-44.

11. Bucher JR, Hailey JR, Roycroft JR et al. Inhalation toxicity and carcinogenicity studies of cobalt sulfate. *Toxicol Sci* 1999; 49: 56–67.
12. Serrano C, Lostalé F, Rodríguez-Panadero F et al. Tracheal self-expandable metallic stents: A comparative study of three different stents in a rabbit model. *Arch Bronconeumol*. 2016; 52(3): 123–30.
13. Lison D, De Boeck M, Verougstraete V et al. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med*. 2001 Oct; 58(10): 619-25.
14. Simonsen LO, Harbak H, Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci Total Environ*. 2012 Aug 15; 432: 210-5.
15. Scharf B, Clement CC, Zolla V et al. Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity. *Sci Rep*. 2014 Jul 17; 4: 5729.
16. Downarowicz P, Mikulewicz M. Trace metal ions release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells by in vivo studies: A literature review. *Adv Clin Exp Med*. 2017 Oct; 26(7): 1155-62.