

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 678**

51 Int. Cl.:

A61L 31/04 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2016 PCT/IB2016/052875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16181371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2016 E 16726187 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3294361**

54 Título: **Stent uretral, métodos y usos del mismo**

30 Prioridad:

14.05.2015 PT 2015108476

26.05.2015 EP 15169249

29.01.2016 PT 2016109122

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.03.2021

73 Titular/es:

**ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF
TISSUE ENGINEERING AND CELL BASED
TECHNOLOGIES & THERAPIES (A4TEC) -
ASSOCIAÇÃO (100.0%)**

**Universidade do Minho, Dept. de Engenharia de
Polímeros 3BS, Research Group, Campus de
Gualtar
4710-057 Braga, PT**

72 Inventor/es:

**GONÇALVES DOS REIS, RUI LUIS;
CRUZ DUARTE, ANA RITA;
ANTUNES BARROS, ALEXANDRE ANTÓNIO;
RODRIGUES DE LIMA, ESTÉVÃO AUGUSTO;
RIBEIRO OLIVEIRA, CARLOS ANDRÉ y
NUNES CORREIA PINTO, JORGE MANUEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 812 678 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Stent uretral, métodos y usos del mismo

5 **Dominio técnico**

La presente divulgación se refiere a los stent uretrales, en particular a una composición para stent uretrales que se usan para garantizar la permeabilidad de un canal, en concreto el uréter, que puede verse comprometido, por ejemplo, por un cálculo urinario, neoplasia o un procedimiento quirúrgico.

10

Antecedentes

Una primera generación de stent uretrales biodegradables basados en polímeros de origen natural desarrollados en el estado de la técnica (descrito en el documento de Barros AA, Rita A, Duarte C, Pires RA, Sampaio-Marques B, Ludovico P, Lima E, Mano JF, Reis RL. 2015. Bioresorbable uretral stents from natural origin polymers; J Biomed Mater Res, Parte B 2015:103B:608-617) ha demostrado ser una alternativa interesante a los stent convencionales, pero sin embargo ha demostrado fracasar en la primera validación *in vivo* en un modelo porcino.

15

20

25

En la primera generación de stent uretrales biodegradables, estos se produjeron usando alginato, goma gellan y una mezcla de estos con gelatina (descritos en Barros AA, Rita A, Duarte C, Pires RA, Sampaio-Marques B, Ludovico P, Lima E, Mano JF, Reis RL. 2015. Bioresorbable uretral stents from natural origin polymers; J Biomed Mater Res Part B 2015:103B:608-617). Se evaluó la adhesión bacteriana de Gram-positiva y Gram-negativa y se comparó con un stent comercial (Biosoft® duo, Porges, Coloplast) y mostró una disminución de adhesión. Se observó que el perfil de biodegradación era altamente dependiente de la composición del stent, con una disolución completa de los stent basados en alginato durante 14 días y de los stent basados en goma gellan hasta 60 días [16]. Una primera generación de stent uretrales biodegradables basados en polímeros de origen natural desarrollados anteriormente ha demostrado ser una alternativa interesante, pero ha fracasado en la primera validación *in vivo* debido a sus malas propiedades mecánicas (figura 6D).

30

35

40

45

50

55

Los efectos adversos más frecuentes notificados por los pacientes que experimentan colocación de stent uretral son dolor y dificultades en las vías urinarias [1]. Estos problemas pueden afectar significativamente a la calidad de vida del paciente con pérdida de días de trabajo, fugas urinarias y dificultades sexuales [2]. En los últimos años, se han sometido a prueba nuevos diseños de stent uretral con polímeros novedosos, recubrimientos y la incorporación de compuestos activos en un intento de reducir significativamente los problemas más comunes como infección bacteriana e incrustación [2-4]. Lange *et al* [1] en una revisión reciente concluyeron que el stent del futuro será degradable, de manera controlada, y posible de recubrir o eluir compuestos activos. Actualmente no está disponible en el mercado ningún stent uretral biodegradable, aunque en el último año ha habido un creciente interés en este campo [1]. Se han usado polímeros como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli(láctico-co-glicólico) y materiales basados en alginato para desarrollar los stent uretrales biodegradables [5-9]. Lumiaho, J. *et al* informaron de estudios *in vivo* en modelo porcino usando stent basados en ácido poliláctico y ácido poli(láctico-co-glicólico) que han mostrado buenas propiedades como propiedades antirreflujo y drenaje favorable, pero la biocompatibilidad y el perfil de degradación se demostró que eran insuficientes para uso clínico [5,10,11]. Los mismos stent uretrales mostraron un comportamiento diferente en un modelo canino, presentando una buena biocompatibilidad y degradación que ocurrió en 12 semanas [12]. Otros estudios que usaron stent uretrales basados en ácido poli(láctico-co-glicólico) informaron de propiedades radiopacas favorables y de drenaje, pero la biocompatibilidad se vio comprometida, según lo informado en la bibliografía [5,13-15]. La degradación de los stent uretrales debe ser uniforme y homogénea, evitando la formación de fragmentos durante el proceso de degradación que pueden bloquear el uréter [1,6,16]. Un stent Uriprene (Poly-Med, EE.UU.), un stent radiopaco basado en ácido glicólico-láctico se ha diseñado para degradarse en la dirección de la espiral vesical a la espiral renal evitando la obstrucción uretral secundaria para la degradación de fragmentos de stent [1]. Los estudios de modelo porcino *in vivo* de Uriprene informaron de una buena estabilidad y biocompatibilidad, con una degradación predecible durante 2-4 semanas manteniendo el drenaje. En estudios anteriores, se informó de un stent uretral producido con polímeros de base natural procesados por secado de punto crítico con dióxido de carbono [16]. Sin embargo, este estudio no fue el primero en la bibliografía en informar de stent uretrales temporales basados en polímero de alginato. Lingeman *et al* [9,17] mostraron en ensayos clínicos en fase I y fase II que estos stent uretrales se diseñaron para estar intactos al menos 48 h antes de la degradación con drenaje urinario facilitado, tolerabilidad favorable y perfiles de seguridad. El problema de estos stent basados en alginato es el hecho de que presentaron un perfil de disolución no homogéneo y fragmentación que resultó en la necesidad de procedimientos secundarios para retirar fragmentos en algunos pacientes.

60 **Descripción general**

El stent uretral de la presente divulgación supera el bajo rendimiento mecánico encontrado en la técnica anterior. Sorprendentemente una concentración específica de gelatina y alginato como sustrato junto con un recubrimiento de resina biodegradable polimérica de dicho sustrato polimérico, da como resultado stent con mayores propiedades mecánicas. Estas nuevas composiciones de stent uretral sorprendentemente no fallan en el tratamiento *in vivo* de mamíferos (véase la figura 6D, 7 y 8), y al mismo tiempo permite la formación del nuevo tejido y evita una segunda

65

intervención quirúrgica.

En una realización, los stent uretrales biodegradables de la presente divulgación se recubrieron con una resina biodegradable polimérica. El análisis morfológico de la superficie de los stent se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido. La exploración por rayos X demostró la radiocapacidad de los stent biodegradables de la presente divulgación. La degradación de los stent uretrales biodegradables se evaluó en disolución de orina artificial y se observó que la degradación de los materiales ocurre *in vitro* entre 9 y 15 días. La degradación estuvo seguida por la pérdida de peso de las muestras y por el análisis químico de las disoluciones tanto por plasma acoplado por inducción (ICP) como por cromatografía de permeación en gel (GPC). La formulación con mayor cantidad de gelatina ha mostrado un buen rendimiento mecánico en cuanto a propiedades de tracción en comparación con el stent comercial (Biosoft® duo, Porges, Coloplast), y la concentración de reticulación ha mostrado no tener una gran influencia en el comportamiento mecánico del stent.

En una realización, se validó en el presente documento el rendimiento *in vivo* de stent uretrales de la presente divulgación. Los stent uretrales biodegradables se colocaron en los uréteres de un cerdo hembra, siguiendo el procedimiento quirúrgico normal. Los animales permanecieron asintomáticos, con flujo de orina normal, los stent permanecieron intactos durante los primeros 3 días y después de 10 días se degradaron totalmente los stent uretrales de la presente divulgación. Esta nueva formulación combinada con un nuevo proceso productivo supera los problemas verificados con la primera generación de stent biodegradables de base natural (descrita en Barros AA, Rita A, Duarte C, Pires RA, Sampaio-Marques B, Ludovico P, Lima E, Mano JF, Reis RL. 2015. Bioresorbable urethral stents from natural origin polymers; J Biomed Mater Res Part B 2015:103B:608-617).

La solución dada a conocer ahora se refiere a una composición para stent biodegradables, en particular a stent uretrales. Esta divulgación supera los problemas encontrados en los stent disponibles, en particular, stent uretrales, ya que en concreto:

evita la necesidad de una segunda cirugía para la retirada de stent;

disminuye la morbilidad en pacientes sometidos a un procedimiento quirúrgico;

disminuye o elimina el riesgo de infección después de la implantación del stent uretral.

Los problemas mencionados en la técnica anterior se resuelven sorprendentemente por la composición de la presente materia objeto que proporciona un stent:

que no es rechazada por el cuerpo de mamíferos,

este stent tiene propiedades mecánicas mejoradas y permite la implantación *in vivo* del dispositivo en el modelo animal de mamífero.

se eliminó por el paciente mamífero sometido a un procedimiento quirúrgico, y

que está en el organismo suficiente tiempo para recuperarse del procedimiento quirúrgico realizado.

Además, la composición de la presente materia objeto puede comprender además agente activo/terapéutico de liberación local, en particular antiinflamatorio, antimicrobiano, un agente anticancerígeno, o mezclas de los mismos. Sorprendentemente se lograron resultados donde el fármaco terapéutico se incorpora en el sustrato polimérico.

La presente divulgación se refiere, en particular, a una nueva composición y a un nuevo método de moldeo por inyección y secado para fabricar los stent, en particular stent uretrales. Adicionalmente, los stent uretrales degradables se recubrieron con un polímero biodegradable. En particular, esta divulgación hace que los stent uretrales degradables realizadas por polímeros de origen natural sea un éxito *in vivo*, se sometieron a prueba cuatro formulaciones con diferentes concentraciones de gelatina y alginato y diferentes concentraciones de agente de reticulación para obtener mayores propiedades mecánicas.

La composición de la presente materia objeto es degradable por el organismo del mamífero y la combinación con el método de obtención de dicho stent evita la obstrucción del stent por sí mismo cuando está en contacto con un fluido, en concreto en el organismo de mamífero.

La presente divulgación se refiere a un stent, en concreto un stent uretral, que comprende un sustrato polimérico en el que el sustrato polimérico comprende un 10-50% (p/p) de alginato y un 45-85% (p/p) de gelatina; y una resina biodegradable polimérica para recubrir dicho sustrato polimérico.

En una realización, para mejores resultados, el sustrato polimérico puede comprender un 20-40% (p/p) de alginato y un 55-70% (p/p) de gelatina.

En una realización, para mejores resultados, se añade una disolución de 3-50% (p/v) de resina a dicho stent; preferiblemente se añade una disolución de un 5-20% (p/v) de resina a dicho stent, más preferiblemente una disolución de un 5-10% (p/v) de resina a dicho stent.

5 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente de contraste, en concreto un agente de contraste de rayos X. En una realización, se añadió bismuto para conferir propiedades radiopacas al stent.

10 En una realización, para mejores resultados, el stent dado a conocer ahora puede comprender:
2-5% (p/p) del agente de contraste, preferiblemente 5% (p/p) del agente de contraste, en concreto carbonato de bismuto (III);

15 el sustrato polimérico puede comprender un 20-40% (p/p) de alginato y un 55-70% (p/p) de gelatina, preferiblemente el sustrato polimérico puede comprender un 30% (p/p) de alginato y un 65% (p/p) de gelatina.

20 En una realización, para obtener mejores resultados, la resina biodegradable polimérica para recubrir el sustrato polimérico puede seleccionarse de la siguiente lista: resina de policaprolactona, poliglicólido y sus copolímeros: ácido poli(láctico-co-glicólico con ácido láctico), poli(glicólido-co-caprolactona) con ϵ -caprolactona y poli(carbonato de glicólido-co-trimetileno) con carbonato de trimetileno, o mezclas de los mismos.

En una realización, para mejores resultados, el agente de contraste puede seleccionarse de la siguiente lista: sales de bario, sales de bismuto, pigmentos de espinela o mezclas de los mismos, en particular carbonato de bismuto (III).

25 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente de reticulación, en la que dicho agente de reticulación es un elemento de reticulación químico que comprende un grupo funcional capaz de reaccionar con aminos de gelatina, preferiblemente el agente de reticulación se selecciona de la siguiente lista: agentes de reticulación iónica incluyen iones monovalentes o divalentes, de los cuales el catión es calcio, magnesio, bario, estroncio, boro, berilio, aluminio, hierro, cobre, cobalto, plomo o plata; el anión se selecciona del grupo que
30 consiste en cloruro, nitrato, fosfato, citrato, borato, succinato, maleato u oxalato, o mezclas de los mismos.

En una realización, para obtener mejores resultados, el agente de reticulación puede seleccionarse de un grupo que consiste en cloruro de calcio, genipina, glutaraldehído, carbodiimidas, y mezclas de los mismos.

35 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente terapéutico, en concreto, un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente anticancerígeno, un agente antiviral o mezclas de los mismos.

40 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente antiinflamatorio seleccionado de la siguiente lista: prednisolona, metilprednisolona, fluorometolona, dexametasona, betametasona, hidrocortisona, medrisona, loteprednol, rimexolona, triamcinolona, diclofenaco, ketorolaco, flurbiprofeno, indometacina, suprofen, ibuprofeno, ketorolaco trometamina, emedastina, levocabastina, azelastina, olopatadina, ketotifeno, ketoprofeno, cromolina, yodoxamida o mezclas de los mismos.

45 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente antimicrobiano seleccionado de la siguiente lista: amoxicilina, dicloxacilina, augmentina, cefalosporinas, gentamicina, tobramicina, neomicina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, ofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina o mezclas de las mismas.

50 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente anticancerígeno seleccionado de la siguiente lista: metotrexato, vinblastina, doxorubicina, cisplatino, factor estimulante de colonias de granulocitos, gemcitabina, carboplatino, 5-fluorouracilo, ifosfamida, pemetrexed, paclitaxel, epirubicina, mitomicina C, capecitabina, Bacillus Calmette- Guerin (BCG) o mezclas de los mismos.

55 En una realización, para mejores resultados, el stent puede comprender además un agente antiviral seleccionado de la siguiente lista: aciclovir, valaciclovir, famciclovir o mezclas de los mismos.

En una realización, para mejores resultados, el agente terapéutico puede incorporarse en el sustrato polimérico.

60 En una realización, para mejores resultados, el agente terapéutico puede incorporarse en el recubrimiento del sustrato polimérico.

En una realización, para mejores resultados, el stent ahora puede ser para uso en medicina humana o veterinaria, en particular, el stent puede ser para uso en medicina regenerativa o ingeniería tisular.

65 En una realización, para mejores resultados, el stent puede ser para uso en la prevención o tratamiento de

enfermedades urológicas.

En una realización, para mejores resultados, el stent dada a conocer ahora puede ser un stent uretral.

5 La presente divulgación también se refiere a un método de producción de una stent, en particular un stent uretral, que comprende las siguientes etapas:

disolver alginato, gelatina en agua a 40-90 °C, preferiblemente 70 °C;

10 agitar a 300-1500 rpm, durante 30 minutos-3 horas, preferiblemente a 600 rpm y durante 1 hora para obtener un sustrato polimérico;

añadir opcionalmente un elemento de reticulación químico al sustrato polimérico;

15 inyectar el sustrato polimérico en un molde para obtener un stent;

colocar el stent en una disolución de alcohol durante 30 minutos-3 horas, preferiblemente durante 1 hora;

20 colocar el stent en una disolución de agente de reticulación de 0,05-2 M en agitación constante durante 1-24 horas, preferiblemente durante 2 horas, a 20-25 °C;

colocar el stent en una disolución de alcohol;

25 secar el stent en un recipiente de alta presión con un fluido supercrítico, en particular dióxido de carbono, a 35-60 °C, 71-200 bar y 60-360 minutos, en modo continuo;

sumergir el stent en agua durante 15-90 minutos, preferiblemente 30 minutos;

30 sumergir el stent en etanol durante 1-5 horas, preferiblemente durante 1 hora;

secar el stent a 20-25 °C durante 1 día;

35 sumergir la stent en una disolución de resina al 5-20%, preferiblemente 10% de policaprolactona durante 5-30 segundos, preferiblemente 10 segundos;

secar a 15-35 °C, preferiblemente 20 °C y durante 12-24 horas, preferiblemente durante 15 horas.

40 En una realización, para mejores resultados, la etapa de disolver alginato y gelatina puede comprender además disolver carbonato de bismuto (III).

45 En una realización, para mejores resultados, la etapa de añadir el agente de reticulación puede hacerse por impregnación de fluido supercrítico a 35-50 °C, 100 bar y durante 2 horas o por adición del agente terapéutico al sustrato polimérico.

50 En una realización, para mejores resultados, la concentración del agente de reticulación, preferiblemente un agente de reticulación iónica, puede ser de entre 5-50 mM, preferiblemente de 5-20 mM.

55 En una realización, para obtener mejores resultados, la concentración de la disolución de agente de reticulación puede ser de 0,24 M, 0,48 M, 1M.

60 En una realización, para mejores resultados, la etapa de secado en el recipiente de alta presión con dióxido de carbono puede llevarse a cabo a 40 °C, 100 bar y 90 minutos.

65 La presente divulgación se refiere también a una composición para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades urológicas que comprende alginato, gelatina y una resina biodegradable polimérica,

en la que dicha composición se administra en un stent biodegradable,

60 en la que dicho stent comprende un 10-50% (p/p) de alginato y un 45-85% (p/p) de gelatina, como sustrato, y la resina biodegradable polimérica como recubrimiento de sustrato.

65 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprender" y las variaciones de la palabra, no se pretende que excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se volverán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las siguientes figuras proporcionan realizaciones preferidas para la presente divulgación y no deben considerarse como limitantes del alcance de la divulgación.

5 Figura 1. Micrografías de SEM del stent uretral biodegradable (6 Fr, formulación 2, 0,48 M) a) antes de recubrir, b) después de recubrir, c) mayor amplificación de una capa de hidrogel d) mayor amplificación de dos capas de recubrimiento e hidrogel.

10 Figura 2. Radiografía en el modo de abdomen de a) stent uretral comercial (Biosoft® duo, Porges, Coloplast) y b) stent uretral biodegradable desarrollada (formulación 2, 0,48 M)

Figura 3. Pérdida de peso de stent uretrales biodegradables desarrolladas a) Diferentes ensayos de formulaciones y b) Formulación 2 con diferente concentración de reticulación.

15 Figura 4. Cromatogramas de GPC de materias primas de stent (alginato y gelatina) y los productos lixiviables en los puntos de tiempo de 1, 3, 6 y 9 días.

Figura 5. Estudio de citotoxicidad por viabilidad celular medida después de 72 h.

20 Figura 6. Propiedades mecánicas de los stent biodegradables (concentración de reticulación de 0,48M) antes y después de recubrimiento de PCL en cuanto a a) carga máxima (N) b) deformación por tracción máxima (%) y c) módulo de Young (MPa). d) Imágenes de stent biodegradables antes y después de recubrimiento en estado seco y en inmersión en estado húmedo en AUS (barra de escala de 2 mm). Control - (Biosoft® duo, Porges, Coloplast). Los valores se representan como promedio \pm DE, n = 3. Diferencias estadísticas (*p < 0,05, **p < 0,01) usando ANOVA de una vía seguido de una prueba a posteriori de Tukey.

Figura 7. Propiedades mecánicas de los stent biodegradables preparadas con la formulación 2 con diferentes concentraciones de agente de reticulación antes y después de recubrimiento de PCL en cuanto a a) carga máxima (N), b) deformación por tracción máxima (%), c) módulo de Young (MPa) y d) deformación por tracción máxima (%) de formulación 2 de stent uretral durante el tiempo de degradación. Los valores se representan como promedio \pm DE, n = 3. Diferencias estadísticas (*p < 0,05, **p < 0,01) usando ANOVA de una vía seguido de una prueba a posteriori de Tukey.

35 Figura 8. Ureteroscopia convencional del uréter con stent *in vivo* en un modelo porcino: a) colocación de stent uretral biodegradable b) stent uretral biodegradable dentro del uréter de cerdo de orificio derecho en el momento de colocación c) stent uretral biodegradable después de 3 días en la entrada del uréter de cerdo de orificio derecho d) después de 3 días con el stent uretral biodegradable e) después de 10 días del stent uretral biodegradable f) uréter de cerdo de orificio derecho después de la degradación en el día 10.

40 Figura 9. Stent uretral biodegradable reticulado con genipina dentro del uréter de cerdo de orificio derecho después de 4 días de la colocación.

Materiales y métodos

45 Materiales - En una realización se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Alemania) sal sódica de ácido algínico, gelatina, urea, ureasa tipo IX de Canavalia ensiformis (Jack Bean), cloruro de calcio, cloroformo, etanol, carbonato de bismuto (III) básico, fosfato sódico dibásico y azida sódica. Se obtuvieron de Riedel-de Haën (Alemania) dihidrógeno-ortofosfato de potasio y hexahidrato de cloruro de magnesio.

50 El estándar de bismuto para ICP se obtuvo de Sigma-Aldrich (Alemania). La resina de policaprolactona PCL 787, disponible comercialmente como polímero TONE™, se obtuvo de Union Carbide Chemicals and Plastics Division, Bound Brook, Nueva Jersey. Dióxido de carbono (99,998 mol%) se suministró por Air Liquide (Portugal). Todos los reactivos se usaron tal como se recibieron sin ninguna purificación adicional.

55 Preparación de segunda generación de stent uretrales biodegradables- En una realización, los polímeros se disolvieron en agua destilada caliente (70 °C) a diferentes concentraciones, tal como se describe en la tabla 1. Las disoluciones se agitaron durante 1 hora y la disolución polimérica se inyectó en un molde para obtener una estructura tubular. Después de 1 hora la pieza se sacó del molde y se colocó en disolución de alcohol (100% de etanol) durante 1 hora. Los stent se transfirieron entonces a una disolución de reticulación de cloruro de calcio (CaCl₂), con diferentes concentraciones (tabla 1) a temperatura ambiente. Tras la reticulación, los stent se reubicaron en una disolución alcohólica (100% de etanol) para obtener un gel de alcohol que puede secarse en un recipiente de alta presión con dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) a presión controlada (100 bar) y temperatura (40 °C) y un flujo continuo de scCO₂ durante 90 minutos. Finalmente, los stent secas se sumergieron en agua destilada durante 30 min y en etanol al 100%, durante 1 hora, para retirar la plantilla. Los stent se secaron finalmente a temperatura ambiente, durante 1 día. El recubrimiento de los stent se realizó por inmersión en un 10% de resina de policaprolactona (PCL) 787 disuelta

en cloroformo. Los stent se secaron en condiciones ambientales durante la noche. También se muestran Biosoft® duo comercial, Porges, Coloplast usados como control en este estudio.

Tabla 1. Sumario de las formulaciones sometidas a prueba para preparar los diferentes stent uretrales biodegradables.

Formulación	Concentración de material: (% en peso)				Agente de reticulación	Concentración de agente de reticulación (M)
	1	2	3	4		
Alginato	10	30	45	50	CaCl ₂	0,24
Gelatina	85	65	50	45		0,48
Carbonato de bismuto (III) básico	5	5	5	5		1
Recubrimiento						10% de resina PCL 787

Microscopía electrónica de barrido - En una realización, se analizó la morfología de los stent biodegradables en un SEM JEOL, modelo JSM-6010LV. Las muestras se fijaron con cinta adhesiva conductora mutua sobre portamuestras de aluminio y se recubrieron con oro/paladio usando un elemento de recubrimiento de pulverización.

Rayos X postoperatorios - En una realización, se evaluaron las características radiopacas del stent uretral biodegradable desarrollada en un equipo de rayos X posoperatorio ubicado en el Departamento de obtención de imágenes del hospital de Braga, Portugal. Las radiografías se tomaron en modo abdomen con amplificación de 0,27x.

Estudio de degradación - En una realización, se midió la degradación de stent biodegradables en función de la pérdida de peso de las muestras. Las muestras (10 mg) se sumergieron en disolución de orina artificial (AUS) preparada según Khandwekar *et al* [18] con la composición presentada en la tabla 2. Las muestras sumergidas se secaron y se pesaron para determinar la pérdida de peso, que se calculó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = (W_f - W_i) / W_i * 100 \quad (1)$$

Donde W_f es el peso final de la muestra (secada después de la inmersión) y W_i es el peso inicial de la muestra. Cada formulación se sometió a prueba por triplicado.

Tabla 2. Composición de la disolución de orina artificial (AUS).

	Componente	% p/v
Disolución A	Dihidrógeno-ortofosfato de potasio	0,76
	Hexahidrato de cloruro de magnesio	0,36
	Urea	1,60
Disolución B	Hexahidrato de cloruro de calcio	0,53
	Ovoalbúmina de pollo	0,2
Ureasa tipo IX de <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack Bean)		0,125

Cromatografía de permeación en gel (GPC) - En una realización, 5 mg de alginato, gelatina y bismuto se disolvieron en 5 ml de una disolución acuosa de fosfato sódico dibásico 0,01 M que contiene 0,1 M de azida sódica (pH 6,6) y se usaron como controles, mientras que las disoluciones de inmersión obtenidas por prueba de degradación de formulación 2 de stent en un punto de tiempo específico (1, 3, 6 y 9 días) se liofilizó y luego se disolvió en 5 ml del mismo eluyente. Las disoluciones se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm y se analizaron en un cromatógrafo de permeación en gel (Malvern, Viscotek TDA 305) con refractómetro, dispersión de luz en ángulo recto y detectores de viscosímetro en un conjunto de cuatro columnas: precolumna Suprema de 5 μm 8 x 50 S/N 3111265, Suprema de 30 \AA 5 μm 8 x 300 S/N 3112751, Suprema de 1000 \AA 5 μm 8 x 300 S/N 3112851 PL y Aquagel- OH MIXED de 8 μm 7,5 x 300 S/N 8M-AOHMIX-46-51, con detección de índice de refracción (Detector de IR 8110, Biscoff). Se realizó elución a 30°C usando un caudal de 1 ml min⁻¹. Los tiempos de elución y la señal de detector de IR se calibraron con un conjunto de polisacárido de calibración comercial de Varian que contiene 10 calibrantes Pullulan con polidispersidad estrecha y M_p (masa molecular en el máximo pico) que oscilan de 180 Da a 708 kDa.

Pasma acoplado por inducción (ICP) - En una realización, las disoluciones de inmersión de la prueba de degradación de los stent, formulación 2, se filtraron y se analizaron por plasma acoplado por inducción (ICP) para seguir la concentración de bismuto (Bi) durante los diferentes momentos de degradación. Se midió la absorción de muestra a longitudes de onda específicas ($k = 206,17 \text{ nm}$ para Bi), y se determinó la concentración de bismuto usando curvas de calibración previamente obtenidas con el estándar de bismuto para ICP (Sigma) ($R^2 = 0,96$).

5 Evaluación de citotoxicidad de los productos lixiviables - En una realización, se accedió a la citotoxicidad de los materiales lixiviables durante la degradación de stent uretral en la AUS según el estándar ISO/10993 [19]. La citotoxicidad de las muestras se evaluó usando una línea celular de fibroblastos pulmonares de ratón inmortalizado (L929) comprada a la Colección Europea de Cultivos Celulares. En primer lugar, se liofilizaron las disoluciones de inmersión obtenidas por prueba de degradación en un punto de tiempo específico (1, 3, 6 y 9 días) de la formulación 2 de stent. Los productos lixiviables se disolvieron en medio basal DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco; Sigma-Aldrich, Alemania) FBS al 10% (suero bovino fetal inactivado por calor, Biochrom AG, Alemania) y antimicótico-antibiótico al 1% (Gibco, Reino Unido). Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El efecto de los productos lixiviables sobre el metabolismo celular se realizó usando una prueba de viabilidad estándar MTS (Cell Titer 96® Aqueous Solution Cell Proliferation Assay, Promega, EE. UU.). Se usó un extracto de caucho de látex como control positivo para la muerte celular; mientras que el medio de cultivo celular se usó como control negativo que representa la situación ideal para la proliferación celular. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTS después de 72 h. Esto se cuantificó por espectroscopia UV, leyendo la absorbancia de formazano a 490 nm en un lector de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, EE. UU.). Cada formulación de muestra y el control se sometieron a prueba usando 12 réplicas.

20 Análisis mecánico de tracción - En una realización, se evaluó el análisis mecánico de tracción de los stent biodegradables usando un INSTRON 5540 (Instron Int. Ltd, High Wycombe, Reino Unido) máquina de ensayo universal con una célula de carga de 1 kN. Las muestras húmedas se hidrataron antes del ensayo en AUS durante 4 horas. Las dimensiones de las muestras utilizadas fueron de 5 mm de longitud, 2 mm de anchura y 0,5 mm de grosor. La carga se colocó en la mitad entre los soportes con una longitud (L) de 3 mm. La velocidad de avance fue de 1:5 mm min⁻¹. Para cada condición, las muestras se sometieron a carga hasta la rotura del núcleo. Los resultados presentados son el promedio de al menos tres muestras y los resultados se presentan como la desviación estándar promedio 6.

25 Procedimiento quirúrgico y validación de degradación *in vivo* - En una realización, el estudio preliminar de validación *in vivo* se llevó a cabo en la Universidad de Miño, Braga, Portugal, tras la aprobación formal del comité de revisión de la institución y de acuerdo con su protocolo ético interno para experimentos con animales. Para validar el procedimiento y la degradación del stent se usaron cerdos domésticos hembra con un peso de ≈ 30 kg. No se dio a los cerdos alimento o agua durante 12 h antes del procedimiento. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia general y ventilación mecánica, tal y como se describió anteriormente en detalle [20]. Después de vaciar la vejiga, se insertó un ureteroscopio semirígido de 7 Fr (Karl Storz, Tuttlingen, Alemania) a través de la uretra y se infundió suero. El procedimiento completo fue de acuerdo con la técnica estándar de ureteroscopia. Entonces, se insertó un cable de guía de punta flexible de 88,9 10⁻² mm (0,035 pulgadas) (AQUATRACK® Hydrophilic Nitinol, Cordis®, Johnson & Johnson) en los uréteres. Los stent uretrales biodegradables se guiaron por el cable de guía hasta colocarlo en o bien el uréter derecho o bien en el izquierdo, uno cada vez. Finalmente, se realizó una ureteroscopia convencional con el fin de verificar la degradación y la presencia de cualquier fragmento y la morfología de los uréteres.

40 Análisis estadístico. En una realización, todos los valores de datos se presentan como media ± desviación estándar (DE). Se realizó análisis estadístico usando el software Graph Pad Prism 6.00 (San Diego, EE.UU.). Los valores estadísticos (*p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001) se determinaron usando análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para un promedio de tres a doce réplicas, seguido por la prueba a posteriori de Tukey para todas las comparaciones de medias por pares.

45 Para preparar la segunda generación de stent uretrales biodegradables realizadas por polímeros de origen natural se sometieron a prueba nuevas formulaciones y se optimizó el método de moldeo por inyección y secado. La idea de recubrir el hidrogel con otro material biodegradable con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas del stent también se sometió a prueba con una resina de policaprolactona PCL 787. La resina de policaprolactona se eligió ya que es un material seguro y tiene una rápida degradación en comparación con otros polímeros biodegradables. Los stent uretrales biodegradables se preparan a partir de una disolución acuosa inicial de alginato-gelatina a partir de la cual se induce la gelificación disminuyendo la temperatura seguida de una reticulación iónica con una disolución de CaCl₂. La gelatina y el alginato se eligieron debido a su versatilidad para formar geles y los resultados obtenidos en el estudio anterior [16] combinando gelatina con otros polisacáridos, es posible inducir cambios en la captación de agua, perfil de degradación y particularmente beneficios en cuanto a la adhesión bacteriana. En esta divulgación se añadió bismuto a la formulación. El uso de bismuto en la nueva formulación proporciona propiedades radiopacas al stent uretral debido a las características radiopacas inherentes de este compuesto. Este material ya se usó y demostró que es seguro y ya está aprobado por la FDA [21]. Después de la reticulación de una combinación de etapas en etanol y dióxido de carbono supercrítico se emplearon además para secar los stent uretrales biodegradables. Los parámetros de procedimiento de secado supercrítico se mantuvieron como en la primera versión de estos stent, ya que ya se ha optimizado; el procedimiento de secado de fluido supercrítico usado es un proceso en el que las matrices no se someten a ninguna transición de fase y por lo tanto la integridad de la luz de los stent no está comprometida [22]. Otros métodos de secado diferentes se sometieron a prueba, en concreto, secado al aire, pero la integridad de la luz de los stent se vio comprometida, a diferencia de lo que se observó al usar fluido supercrítico de CO₂.

65 Morfología. La figura 1 presenta las imágenes de SEM de las secciones transversales de stent uretral biodegradable desarrollada según la formulación 2. En la figura 1a se muestra el stent sin recubrimiento y en la figura 1b el stent con

recubrimiento de PCL. Las figuras 1c y 1d son las ampliaciones de la pared de stent. Es posible distinguir las dos capas, la capa externa de recubrimiento de PCL y la capa interna de la matriz de bismuto más alginato-gelatina. El diámetro interno, es decir, la luz del stent es de 2 mm. El diámetro interior y exterior y la longitud de los stent dependen únicamente del molde de inyección usado para preparar los mismos, y no dependen de la formulación sometida a prueba. Al igual que en la primera generación de los stent uretrales biodegradables, la superficie obtenida sin recubrimiento es similar [16].

Validación de rayos X. Una característica importante de los stent uretrales es su radiopacidad. La posibilidad de evaluar por rayos X postoperatorios, localizar el stent en el cuerpo y seguir la degradación durante el tiempo es de gran importancia y para ello se usa un producto estandarizado, en concreto carbonato de bismuto (III) básico, sin embargo, pueden usarse otros. En la figura 2 es posible confirmar la radiopacidad, en estado húmedo, del stent uretral biodegradable desarrollada (figura 2b) en comparación con el stent comercial (figura 2a). En esta divulgación, se usó una menor concentración de este compuesto en la formulación, en comparación con el documento de Lingeman *et al* [21], demostrando inesperadamente que cantidades bajas son adecuadas para proporcionar esta característica al stent.

Estudio de degradación *in vitro* - Se evaluó la degradación *in vitro* de los stent uretrales biodegradables con las diferentes formulaciones y diferentes concentraciones de agente de reticulación midiendo la pérdida de peso de las muestras. La pérdida de peso, medida como el porcentaje de pérdida de masa cuando se sumerge en AUS durante un período de tiempo predeterminado, se presenta en la figura 3. Todas las condiciones sometidas a prueba demostraron *in vitro* que no se produce degradación durante los primeros 3 días de inmersión. Después de 9 días, los stent han mostrado una degradación completa. En comparación con las diferentes formulaciones sometidas a prueba, los resultados sugieren que una mayor concentración de alginato (formulaciones 4 y 5, figura 3a) aumentan el tiempo de degradación. En comparación con las diferentes concentraciones de agente de reticulación (figura 3b), los resultados muestran que cuanto más fuerte es la reticulación, más baja es la degradación, incluso aunque no sea estadísticamente significativo. Esto puede justificarse debido a la presencia de más reticulaciones de calcio con bloques de ácido gúlico (G), aumentando su red reticulada de manera covalente [23]. Los cationes divalentes del agente de reticulación iónica, se unen exclusivamente a los bloques G de las cadenas de alginato adyacentes, dado que la estructura del L-gulonato ofrece una mayor flexibilidad que las cadenas de D-manuronato. Mediante la creación de puentes iónicos entre cadenas, los iones divalentes sustituyen los enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxílico de D-manuronato y los grupos 2-OH y 3-OH del L-gulonato subsecuente, originando la gelificación de disoluciones de alginato acuosas [24,25]. La longitud de bloque G, la concentración del polímero y el peso molecular, por tanto, son factores críticos que afectan a las propiedades físicas de alginato y su consiguiente degradación. Por otro lado, la gelatina puede formar hidrogeles aumentando y disminuyendo la temperatura, que es simplemente un fenómeno de reticulación físico. El mecanismo detrás de la reticulación de moléculas de gelatina es un cambio conformacional de una espiral aleatoria a una triple hélice. La degradación ocurre entonces porque las asociaciones no covalentes se interrumpen fácilmente a temperaturas superiores a 30-35°C, por lo tanto a temperatura corporal [26]. Esto ayuda a entender que con mayores cantidades de gelatina en la formulación se producirá una degradación más rápida. En nuestro estudio anterior, los stent uretrales basados en alginato mostraron una degradación más lenta en comparación con este trabajo, por la misma razón [16]. Sin embargo, la mezcla de polímero con el alginato es desconocida y, por lo tanto, es difícil establecer una correlación de trabajo comparada con la de la formulación dada a conocer ahora.

Cromatografía de permeación en gel (GPC) - Los elementos extraíbles poliméricos a partir de la degradación de stent uretral a los 1, 3, 6 y 9 días se liofilizaron primero y luego se disolvieron en un eluyente apropiado para analizarse por GPC. Como control se inyectaron materias primas de alginato y gelatina. El patrón de GPC de alginato y gelatina muestran una superposición de los picos de elución entre 18 ml y 21 ml de volumen de retención, por lo que no es fácil distinguir ambos. Los elementos extraíbles están compuestos esencialmente por la mezcla de alginato y gelatina presentes en la formulación de stent uretral biodegradable. La superposición de las materias primas hace que sea difícil identificar por separado la presencia del alginato y la gelatina. Sin embargo, es posible ver los picos de la curva de elución con intensidad creciente con el tiempo de degradación. Teniendo en cuenta el volumen de retención de los picos en las diferentes curvas de elución, se observa una importante contribución de gelatina en lugar de alginato. Esto se esperaba porque esta formulación (formulación 2) está compuesta por un 65% de gelatina y un 30% de alginato.

Plasma acoplado por inducción (ICP) - El análisis ICP de la concentración de bismuto en las disoluciones de inmersión desde diferentes puntos de tiempo a partir de la formulación 2 está presente en la tabla 3. Los resultados muestran una liberación gradual de bismuto durante el proceso de degradación del stent a la disolución de orina artificial. Según el perfil de degradación (figura 3a) de stent uretrales, la formulación 2, y el bismuto medido en las disoluciones de inmersión, se muestra que la liberación de bismuto está asociada a la degradación y no ocurre debido al hinchamiento del stent o difusión del stent a la AUS. Para apoyar esta observación y considerando una distribución homogénea del bismuto en el stent, se espera que exista una correlación entre el perfil de degradación y la cantidad de bismuto en disolución. En el día 3 el stent uretral con formulación 2 presenta una degradación de aproximadamente el 5%, que corresponde al valor de bismuto en disolución es 0,271 g/l, es decir, aproximadamente el 5% del bismuto total presente en el stent. Lo mismo se observa en el punto de tiempo del día 6, en el que el valor de 1,285 g/l es el 20% del bismuto total y de nuevo se aproxima al valor de la degradación observada en la figura 3a.

Tabla 3. Concentración de bismuto obtenida por ICP, en disolución de inmersión (AUS) durante la degradación.

Días	Bismuto (g/l)	Std	Liberación (%)
1	0,0570	0,0058	~1%
3	0,271	0,0496	~5%
6	1,285	0,06	~20%
9	5,953	0,1912	100%

5 Citotoxicidad de productos lixiviables - La citotoxicidad de los productos lixiviables obtenidos a partir de la degradación de stent se evaluó de acuerdo con el protocolo descrito en el estándar ISO/EN 10.993 [19]. La viabilidad de las células cultivadas en una placa de cultivo tisular, en presencia de los productos lixiviables, se determinó en función de las células cultivadas en el medio de cultivo de Eagle modificado (DMEM) de Dulbecco. La figura 5 presenta la viabilidad celular después de 72 h en contacto con el material disuelto en el medio de cultivo. Se observaron diferencias significativas para la viabilidad celular en presencia de los productos lixiviables en comparación con el látex, que se usó como control positivo. Los resultados demuestran que no existe interacción tóxica entre los productos lixiviables del día 1 al día 9 y las células L929.

15 Ensayos mecánicos de tracción - Las propiedades mecánicas de tracción como carga máxima (N), deformación por tracción máxima (%) y módulo de Young (MPa) de los stent uretrales biodegradables desarrolladas se presentan en la figura 6 y la figura 7. La figura 6 presenta los resultados en estado seco y húmedo de las cuatro formulaciones diferentes de stent al usar una concentración de agente de reticulación 0,48 M. Como control también se presentan los resultados de tracción para el stent comercial (Biosoft® duo, Porges, Coloplast). Comparando todas las formulaciones estudiadas, se observaron diferencias significativas antes y después de la hidratación y con y sin recubrimiento, en cuanto a sus propiedades mecánicas. En todas las formulaciones y como se espera de la hidratación en AUS (figura 6d) los valores de propiedades de tracción disminuyen en cuanto al módulo de Young pero aumentan en cuanto a deformación por tracción máxima. Además, los stent uretrales después de la hidratación se vuelven más elásticas que en estado seco. Los resultados de las muestras hidratados son mucho más importantes para el propósito clínico. Respecto a los valores más altos, la carga máxima fue de 78,7 N y en cuanto al módulo de Young fue de 49,8 MPa después de la hidratación para los stent recubiertos de la formulación 2. En comparación con 41,2 N y 24,6 MPa, respectivamente, para el stent comercial. Por otro lado, en cuanto a la deformación por tracción máxima (%) o elongación a rotura, el control presenta valores de aproximadamente el 736,5 % en comparación con el 339,1 % obtenido para la formulación 2. En general, la contribución de gelatina parece aumentar las propiedades mecánicas de los stent biodegradables. La hidratación de los stent además contribuye a aumentar la elasticidad del material. Analizando el efecto del recubrimiento de PCL también contribuye a aumentar la elasticidad y la ductilidad de los stent con diferencias significativas. Con el objetivo de estudiar la influencia de la concentración de iones de calcio como agente de reticulación, se sometieron a prueba tres concentraciones diferentes con la formulación 2. Esta formulación se seleccionó de acuerdo con los resultados obtenidos, debido al equilibrio en cuanto a ductilidad y elasticidad del stent uretral biodegradable.

La figura 7 muestra en el presente documento los resultados del stent biodegradable uretral con formulación 2, usando diferentes concentraciones de agente de reticulación, en concreto 0,24 M, 0,48 M y 1M. En comparación con las diferentes concentraciones, los resultados sugieren que la concentración de reticulación no tiene un gran impacto en las propiedades mecánicas finales del stent uretral biodegradable. Aunque se observa un ligero aumento aumentando la concentración de iones de calcio. Se informó de esto precisamente en la bibliografía, los iones aumentan la red vinculada, pero en la presente divulgación la concentración sometida a prueba no afecta demasiado a las propiedades mecánicas de los stent uretrales biodegradables [27].

45 Se midieron las propiedades mecánicas durante el proceso de degradación (figura 7d) y los resultados muestran disminución de las propiedades mecánicas durante el tiempo de degradación. Sin embargo, en el día 6, antes de la degradación completa, el stent uretral (formulación 2) muestra una tracción máxima promedio cerca del 200%. Aunque las propiedades mecánicas disminuyen durante el proceso de degradación, las propiedades parecen ser suficientes para mantener la función del stent uretral antes de la degradación total. Estas observaciones son extremadamente importantes en el caso de que exista la necesidad clínica de retirar los stent sin comprometer la obstrucción del uréter por posibles fragmentos dejados.

55 En la primera generación de stent uretrales biodegradables hechos por polímero natural, los valores obtenidos fueron tres veces menores en comparación con la segunda generación [16]. Claramente, el aumento de la concentración de gelatina, la modificación del proceso de fabricación y una incorporación de un nuevo recubrimiento biodegradable permiten la preparación de un stent uretral biodegradable capaz de usarse *in vivo* tras la ureteroscopía convencional.

60 Se espera que un stent uretral ideal tenga un rendimiento adecuado en cuanto a propiedades mecánicas. En comparación con los resultados de deformación por tracción máxima con unos stent uretrales reabsorbibles hechas de PGA y PLGA [15,28], los materiales de origen natural usados en el presente documento presentan mayor elongación en comparación con los materiales sintéticos. En cuanto al rendimiento mecánico global obtenido en este

estudio demostró ser similar o mejor que el stent comercial disponible, Biosoft® duo, Porges, Coloplast.

Estudio *in vivo* en un modelo porcino - La validación *in vivo* de los stent uretrales biodegradables se realizó en cerdos domésticos hembra diferentes. Se empleó la ureteroscopía convencional para implantar los stent desarrollados. El primer stent sometido a prueba *in vivo* fue la primera generación de stent uretrales biodegradables basados en polímeros de origen natural reportados por Barros *et al* [20]. La primera generación demostró en el procedimiento quirúrgico que los stent se deslizaron perfectamente en el cistoscopio y el cable de guía hidrofílico en el interior en la vejiga a través de la uretra. El stent uretral desarrollado permanece intacto durante todo el procedimiento y no se fragmenta y demostró su fácil retirada si es necesario. Sin embargo, no fue lo suficientemente dúctil para poder colocarse correctamente en el uréter. Por el contrario, esta nueva segunda generación de stent uretrales biodegradables se implantó con éxito *in vivo*. Los stent uretrales biodegradables de esta segunda generación en la formulación 2 se colocaron en los uréteres derechos sin ninguna complicación y como control se colocaron stent comerciales (Biosoft® duo, Porges, Coloplast) en los uréteres izquierdos, siguiendo el procedimiento quirúrgico convencional. En la figura 8 es posible ver la segunda generación de stent biodegradables colocados en los uréteres del modelo porcino. Durante los experimentos todos los animales permanecieron asintomáticos y con un flujo de orina normal. Después de 3 días, se realizó una ureteroscopía a los animales para evaluar la morfología de los uréteres y los stent. El stent biodegradable permanece intacto con una gran estabilidad (figura 8c) y no se observaron efectos secundarios no deseados en los uréteres (figura 8d). En el día 10, se realizó otra ureteroscopía y no se encontraron fragmentos de los stent uretrales biodegradables y la morfología de los uréteres permanece normal sin signos de inflamación o reacciones adversas (figura 8e y 8f). Estos stent uretrales biodegradables preparados a partir de la formulación 2 demostraron estar intactas durante los primeros 3 días y después de 10 días están completamente degradadas y no se observaron residuos de stent en el tracto urinario. Este experimento se repitió tres veces y todos los procedimientos conducen a la misma observación.

Los datos experimentales muestran que una serie de mezclas de alginato y gelatina y diferentes concentraciones de agente de reticulación se usan para obtener un stent uretral biodegradable a partir de polímeros de origen natural que pueden usarse para el tratamiento de trastornos urológicos. En esta segunda generación de stent, es posible ver la radiopacidad, en estado húmedo, del stent uretral biodegradable desarrollado. El estudio *in vitro* muestra que una mayor concentración de gelatina en el stent biodegradable dio como resultado mayores propiedades mecánicas. De lo contrario, a mayor concentración de alginato, degradación *in vitro* más lenta. Los productos de degradación muestran no ser citotóxicos y la degradación de los mismos mostró ser homogénea. La segunda generación de stent uretrales biodegradables desarrollados mostrados podría implantarse siguiendo el procedimiento quirúrgico realizado diariamente en la práctica clínica. El stent uretral permanece intacto durante los primeros 3 días y después comienza a degradarse. La degradación completa se logra después de 10 días, con ninguna presencia de los materiales de stent dentro del animal. Los stent desarrollados demostraron ser seguros y cumplieron la función de mantener el flujo de orina del riñón a la vejiga mientras se implanta en el uréter.

La presente solución no se limita, obviamente, de ninguna manera a las realizaciones descritas en el presente documento y una persona con conocimientos promedios en el área puede predecir muchas posibilidades de modificación de la misma solución y sustituciones de características técnicas por otras equivalentes, dependiendo de los requisitos de cada situación, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las realizaciones descritas anteriormente se pueden combinar entre sí. Las siguientes reivindicaciones definen además las realizaciones preferidas de la presente solución.

Referencias

[1] D. Lange, S. Bidnur, N. Hoag, B.H. Chew, Uretral stent-associated complications[mdash]where we are and where we are going, *Nat Rev Urol.* 12 (2015) 17-25. doi:10.1038/nrurol.2014.340.

[2] C.E. Mendez-Probst, L.W. Goneau, K.W. MacDonald, L. Nott, S. Seney, C.N. Elwood, *et al.*, The use of triclosan eluting stents effectively reduces uretral stent symptoms: a prospective randomized trial, *BJU Int.* 110 (2012) 749-754. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10903.x.

[3] A.E. Krambeck, R.S. Walsh, J.D. Denstedt, G.M. Preminger, J. Li, J.C. Evans, *et al.*, A Novel Drug Eluting Uretral Stent: A Prospective, Randomized, Multicenter Clinical Trial to Evaluate the Safety and Effectiveness of a Ketorolac Loaded Uretral Stent, *J. Urol.* 183 (2010) 1037-1043. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.11.035.

[4] E.N. Liatsikos, D. Karnabatidis, G.C. Kagadis, K. Rokkas, C. Constantinides, N. Christeas, *et al.*, Application of paclitaxel-eluting metal mesh stents within the pig ureter: An experimental study, *Eur. Urol.* 51 (2007) 217-223. doi:DOI 10.1016/j.eururo.2006.05.054.

[5] E.O. Olweny, J. Landman, C. Andreoni, W. Collyer, K. Kerbl, M. Onciu, *et al.*, Evaluation of the use of a biodegradable uretral stent after retrograde endopyelotomy in a porcine model, *J. Urol.* 167 (2002) 2198-2202. doi:Unsp 0022-5347/02/1675-2198/0Doi 10.1016/S0022-5347(05)65128-2.

- [6] A. Al-Aown, I. Kyriazis, P. Kallidonis, P. Kraniotis, C. Rigopoulos, D. Karnabatidis, *et al.*, Uretral stents: new ideas, new designs, *Ther Adv Urol.* 2 (2010) 85-92. doi:10.1177/1756287210370699.
- 5 [7] N. Venkatesan, S. Shroff, K. Jayachandran, M. Doble, Polymers as Uretral Stents, *J. Endourol.* 24 (2010) 191-198. doi:DOI 10.1089/end.2009.0516.
- [8] B.H. Chew, D. Lange, R.F. Paterson, K. Hendlin, M. Monga, K.W. Clinkscales, *et al.*, Next Generation Biodegradable Uretral Stent in a Yucatan Pig Model, *J. Urol.* 183 (2010) 765-771. doi:DOI 10.1016/j.juro.2009.09.073.
- 10 [9] J.E. Lingeman, D.A. Schulsinger, R.L. Kuo, Phase I trial of a temporary uretral drainage stent, *J. Endourol.* 17 (2003) 169-171. doi:Doi 10.1089/089277903321618734.
- [10] J. Lumiaho, A. Heino, V. Tunninen, M. Ala-Opas, M. Talja, T. Valimaa, *et al.*, New bioabsorbable polylactide uretral stent in the treatment of uretral lesions: An experimental study, *J. Endourol.* 13 (1999) 107-112. doi:DOI 10.1089/end.1999.13.107.
- 15 [11] J. Lumiaho, A. Heino, T. Kauppinen, M. Talja, E. Alhava, T. Valimaa, *et al.*, Drainage and antireflux characteristics of a biodegradable self-reinforced, self-expanding X-ray-positive ploy-L,D-lactide spiral partial Uretral stent: An experimental study, *J. Endourol.* 21 (2007) 1559-1564. doi:DOI 10.1089/end.2005.0085.
- 20 [12] J. Lumiaho, A. Heino, T. Pietilainen, M. Ala-Opas, M. Talja, T. Valimaa, *et al.*, The morphological, *in situ* effects of a self-reinforced bioabsorbable polylactide (SR-PLA 96) ureteric stent; An experimental study, *J. Urol.* 164 (2000) 1360-1363. doi:Doi 10.1016/S0022-5347(05)67199-6.
- 25 [13] M. Talja, M. Multanen, T. Valimaa, P. Tormala, Bioabsorbable SR-PLGA horn stent after antegrade endopyelotomy: A case report, *J. Endourol.* 16 (2002) 299-302. doi:Doi 10.1089/089277902760102785.
- [14] J. Lumiaho, A. Heino, S. Aaltomaa, T. Valimaa, M. Talja, A short biodegradable helical spiral ureteric stent provides better antireflux and drainage properties than a double-J stent, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 45 (2011) 129-133. doi:Doi 10.3109/00365599.2010.544673.
- 30 [15] T. Zou, L. Wang, W.C. Li, W.Z. Wang, F. Chen, M.W. King, A resorbable bicomponent braided uretral stent with improved mechanical performance, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 38 (2014) 17-25. doi:DOI 10.1016/j.jmbbm.2014.06.004.
- 35 [16] A.A. Barros, A. Rita, C. Duarte, R.A. Pires, B. Sampaio-Marques, P. Ludovico, *et al.*, Bioresorbable uretral stents from natural origin polymers, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 103 (2015) 608-617. doi:10.1002/jbm.b.33237.
- 40 [17] R.W. Schlick, K. Planz, Potentially useful materials for biodegradable ureteric stents, *Br. J. Urol.* 80 (1997) 908-910. doi:DOI 10.1046/j.1464-410X.1997.00484.x.
- [18] A. Khandwekar, M. Doble, Physicochemical characterisation and biological evaluation of polyvinylpyrrolidoneiodine engineered polyurethane, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1231-1246. doi:10.1007/s10856-011-4285-8.
- 45 [19] ISO/10993, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5. Test for Cytotoxicity *In vitro* Methods: 8.2 Test on Extracts., (1992).
- [20] E. Lima, C. Rolanda, L. Osório, J.M. Pêgo, D. Silva, T. Henriques-Coelho, *et al.*, Endoscopic closure of transmural bladder wall perforations., *Eur. Urol.* 56 (2009) 151-7. doi:10.1016/j.eururo.2008.06.010.
- 50 [21] J.E. Lingeman, G.M. Preminger, Y. Berger, J.D. Denstedt, L. Goldstone, J.W. Segura, *et al.*, Use of a temporary uretral drainage stent after uncomplicated ureteroscopy: Results from a phase II clinical trial, *J. Urol.* 169 (2003) 1682-1688. doi:DOI 10.1097/01.ju.0000055600.18515.a1.
- 55 [22] A.R.C. Duarte, V.E. Santo, A. Alves, S.S. Silva, J. Moreira-Silva, T.H. Silva, *et al.*, Unleashing the Potential of Supercritical Fluids for Polymer Processing in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *J. Supercrit. Fluids.* (2013).
- [23] H.J. Kong, D. Kaigler, K. Kim, D.J. Mooney, Controlling Rigidity and Degradation of Alginate Hydrogels via Molecular Weight Distribution, *Biomacromolecules.* 5 (2004) 1720-1727. doi:10.1021/bm049879r.
- 60 [24] A. Blandino, M. Macías, D. Cantero, Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics, *J. Biosci. Bioeng.* 88 (1999) 686-689. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87103-0.
- 65

- [25] A. Jejurikar, G. Lawrie, D. Martin, L. Grondahl, A novel strategy for preparing mechanically robust ionically cross-linked alginate hydrogels, *Biomed Mater.* 6 (2011). doi:Artn 025010Doi 10.1088/1748-6041/6/2/025010.
- 5 [26] B. Mohanty, H.B. Bohidar, Microscopic structure of gelatin coacervates, *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 39-46. doi:DOI 10.1016/j.ijbiomac.2005.03.012.
- [27] A.D. Augst, H.J. Kong, D.J. Mooney, Alginate Hydrogels as Biomaterials, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 623-633. doi:10.1002/mabi.200600069.
- 10 [28] M.Q. Zhang, T. Zou, Y.C. Huang, Y.F. Shang, G.G. Yang, W.Z. Wang, *et al.*, Braided thin-walled biodegradable uretral stent: Preliminary evaluation in a canine model, *Int. J. Urol.* 21 (2014) 401-407. doi:10.1111/iju.12297.

REIVINDICACIONES

1. Stent que comprende un sustrato polimérico en la que el sustrato polimérico comprende un 10-50% (p/p) de alginato y un 45-85% (p/p) de gelatina;
5 y una resina biodegradable polimérica para recubrir dicho sustrato polimérico.
2. Stent según la reivindicación anterior en la que el sustrato polimérico comprende un 20-40% (p/p) de alginato y un 55-70% (p/p) de gelatina.
10
3. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que se añade una disolución de un 3-50% (p/v) de resina biodegradable polimérica a dicho stent, preferiblemente una disolución de un 5-20% (p/v) de resina biodegradable polimérica, más preferiblemente de un 5-10% (p/v) de resina biodegradable polimérica.
- 15 4. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un agente de contraste, en concreto un agente de contraste de rayos X, preferiblemente el agente de contraste se selecciona de la siguiente lista: sales de bario, sales de bismuto, pigmentos de espinela o mezclas de los mismos, en particular carbonato de bismuto (III).
- 20 5. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:
2-5% (p/p) del agente de contraste, en concreto carbonato de bismuto (III);
20-40% (p/p) de alginato y 55-70% (p/p) de gelatina, que comprende preferiblemente
25 5% (p/p) del agente de contraste, en concreto carbonato de bismuto (III);
30% (p/p) de alginato y 65% (p/p) de gelatina.
- 30 6. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicha resina se selecciona de la siguiente lista: resina de policaprolactona, poliglicólido y sus copolímeros: poli(ácido láctico-co-glicólico con ácido láctico), poli(glicólido-co-caprolactona) con ϵ -caprolactona y poli(carbonato de glicólido-co-trimetileno) con carbonato de trimetileno, o mezclas de los mismos.
- 35 7. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un agente de reticulación, preferiblemente el agente de reticulación es un elemento de reticulación químico que comprende un grupo funcional capaz de reaccionar con aminas de gelatina.
- 40 8. Stent según las reivindicaciones anteriores en la que dicho agente de reticulación se selecciona de la siguiente lista: agentes de reticulación iónica incluyen iones monovalentes o divalentes, de los cuales el catión es calcio, magnesio, bario, estroncio, boro, berilio, aluminio, hierro, cobre, cobalto, plomo o plata; el anión se selecciona del grupo que consiste en cloruro, nitrato, fosfato, citrato, borato, succinato, maleato u oxalato, o mezclas de los mismos; preferiblemente en la que se selecciona el agente de reticulación de un grupo que
45 consiste en cloruro de calcio, genipina, glutaraldehído, carbodiimidias y mezclas de los mismos.
9. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un agente terapéutico, en concreto un agente antiinflamatorio, un agente antimicrobiano, un agente anticancerígeno, un agente antiviral o mezclas de los mismos.
- 50 10. Stent según la reivindicación anterior en el que:
el agente antiinflamatorio se selecciona de la siguiente lista: prednisolona, metilprednisolona, fluorometolona, dexametasona, betametasona, hidrocortisona, medrisona, loteprednol, rimexolona, triamcinolona, diclofenaco, ketorolaco, flurbiprofeno, indometacina, suprofen, ibuprofeno, ketorolaco trometamina,
55 emedastina, levocabastina, azelastina, olopatadina, ketotifeno, ketoprofeno, cromolina, yodoxamida o mezclas de los mismos y/o;
el agente antimicrobiano se selecciona de la siguiente lista: amoxicilina, dicloxacilina, augmentina, cefalosporinas, gentamicina, tobramicina, neomicina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, ofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina o mezclas de los mismos y/o;
60 el agente anticancerígeno se selecciona de la siguiente lista: metotrexato, vinblastina, doxorubicina, cisplatino, factor estimulante de colonias de granulocitos, gemcitabina, carboplatino, 5-fluorouracilo, ifosfamida, pemetrexed, paclitaxel, epirubicina, mitomicina C, capecitabina, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) o mezclas de los mismos;
65

el agente antiviral se selecciona de la siguiente lista: aciclovir, valaciclovir, famciclovir o mezclas de los mismos y/o;

5 en el que el agente antiviral se selecciona de la siguiente lista: aciclovir, valaciclovir, famciclovir o mezclas de los mismos.

11. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que el agente terapéutico se incorpora en el sustrato polimérico o es el recubrimiento del sustrato polimérico.

10 12. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en medicina humana o veterinaria.

13. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en medicina regenerativa o ingeniería tisular, preferiblemente para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades urológicas.

15 14. Stent según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el stent es un stent uretral.

15. Composición para uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades urológicas que comprende alginato, gelatina y una resina biodegradable polimérica,

20 en la que dicha composición se administra en un stent biodegradable,

en la que dicho stent comprende un 10-50% (p/p) de alginato y un 45-85% (p/p) de gelatina, como sustrato, y la resina biodegradable polimérica como recubrimiento de sustrato.

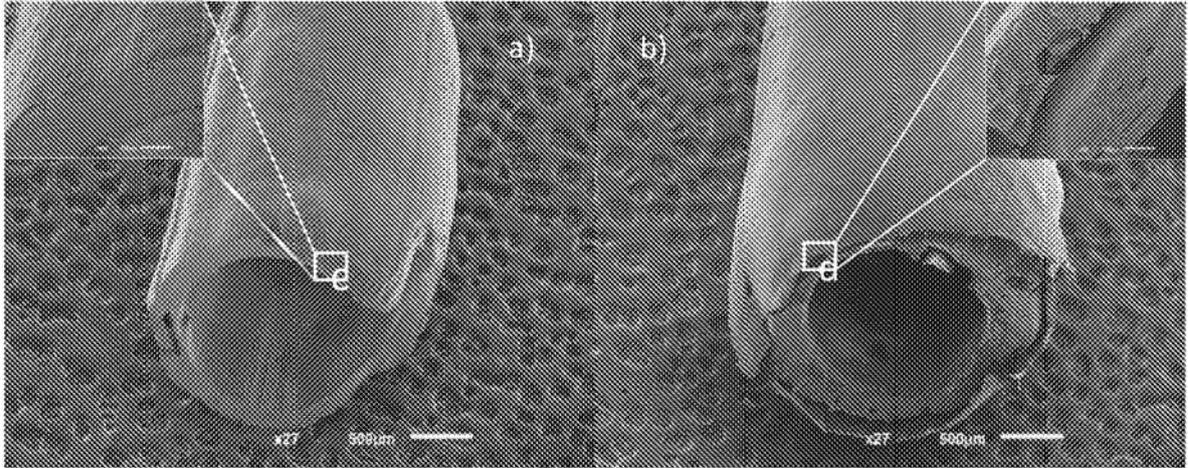


Fig. 1

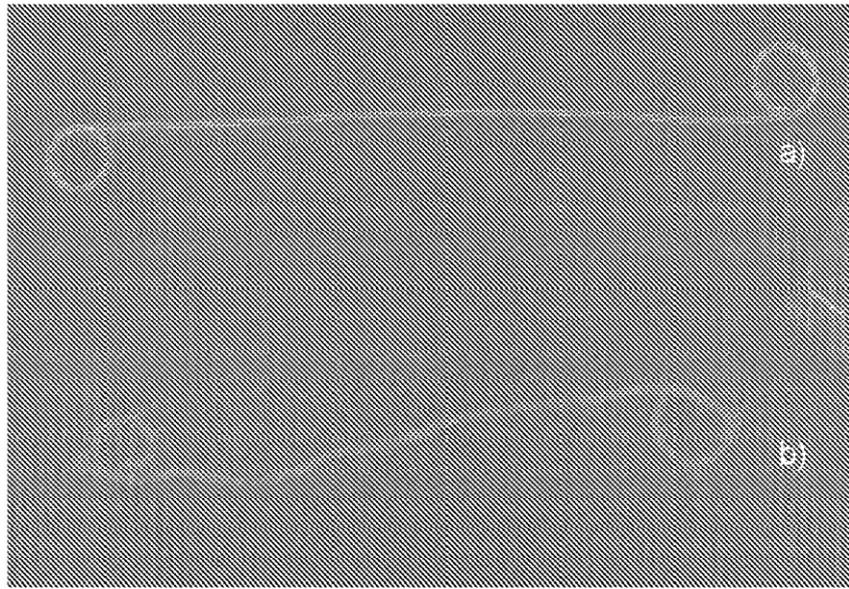


Fig. 2

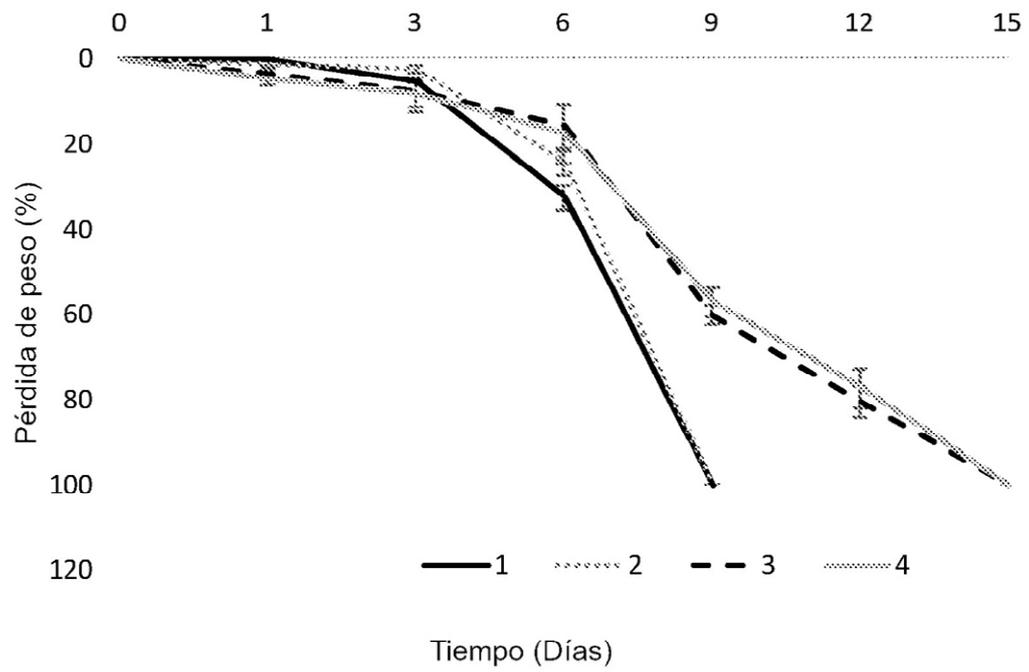


Fig. 3a

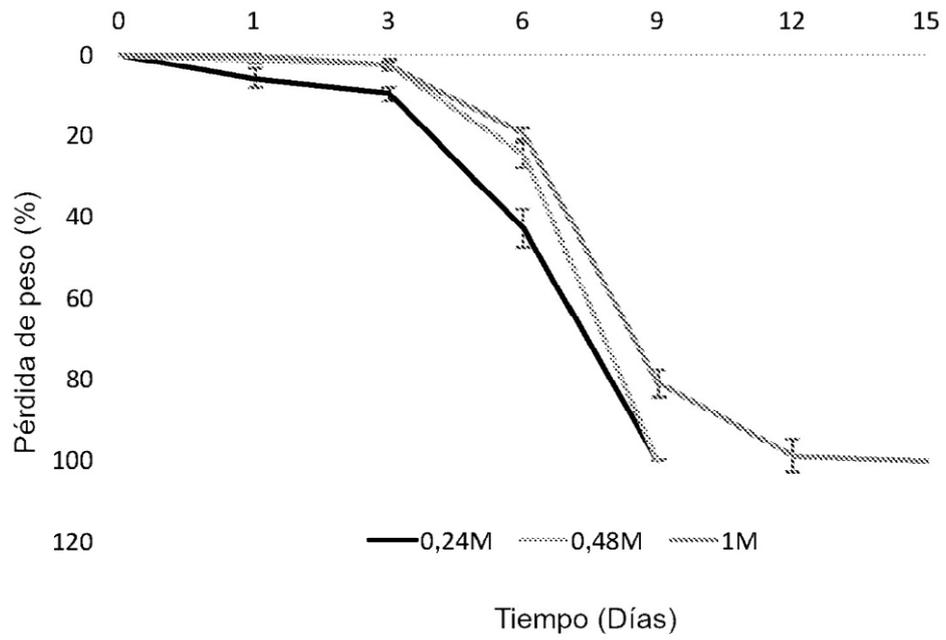


Fig. 3b

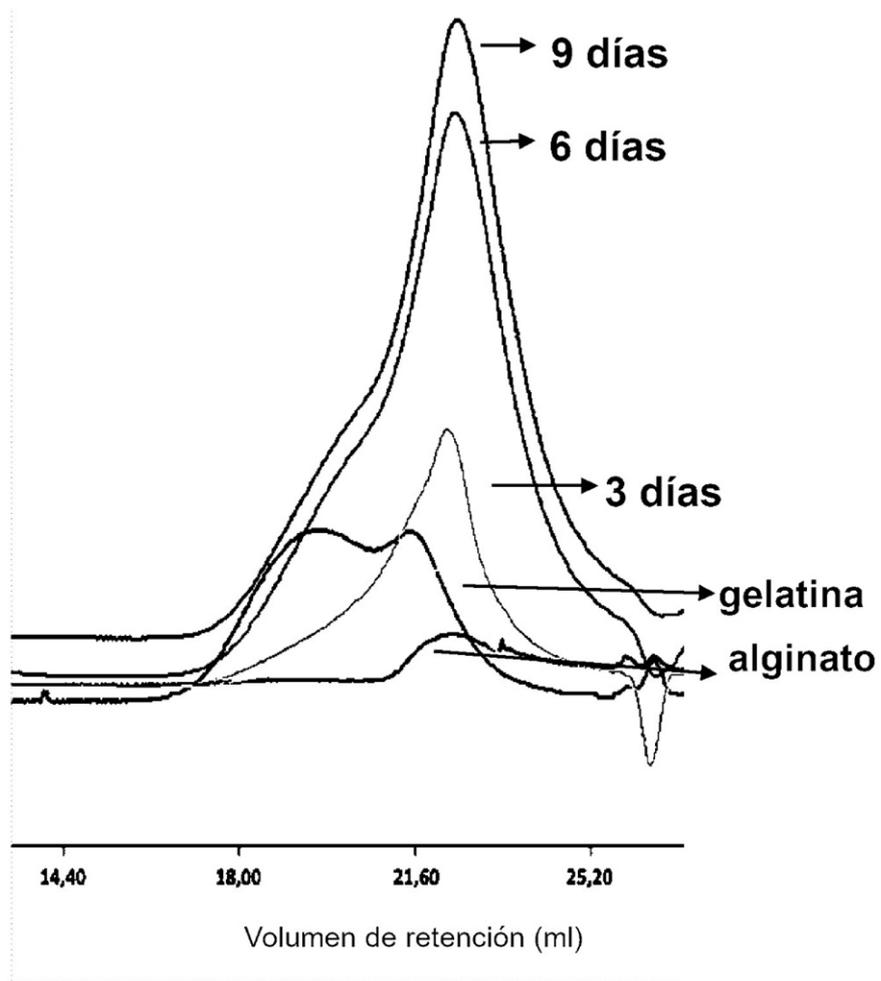


Fig. 4

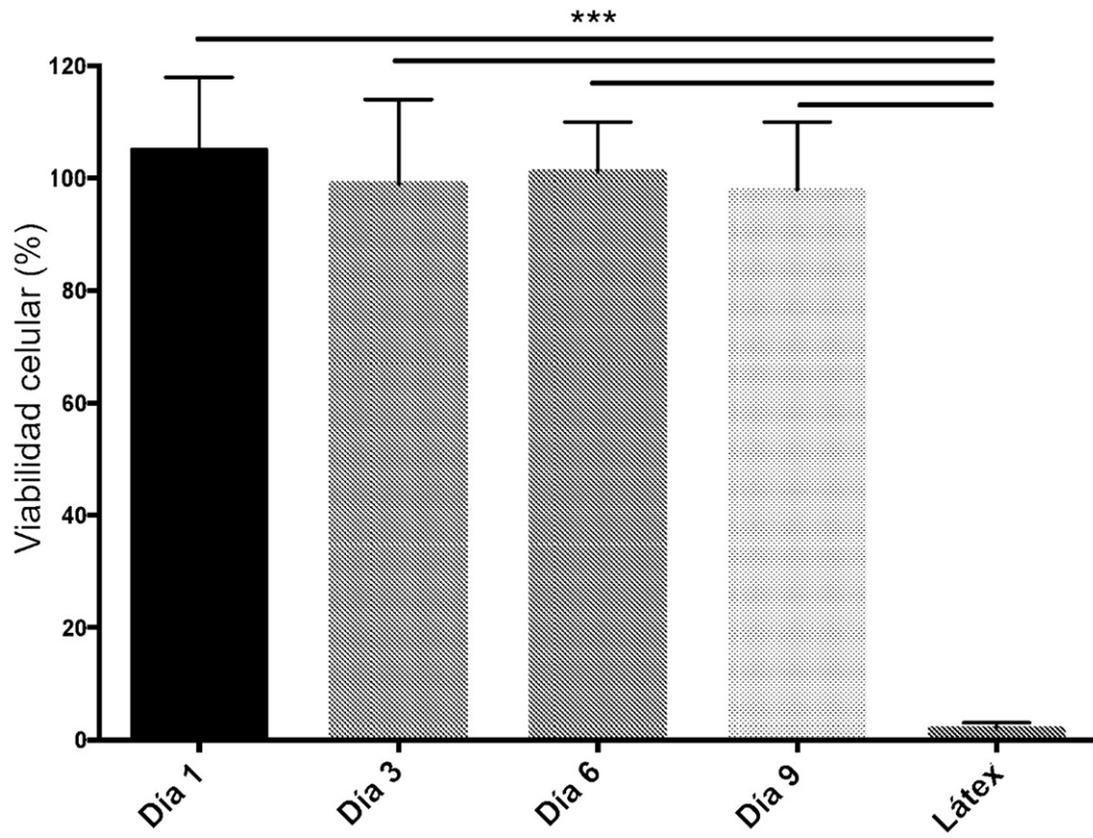


Fig. 5

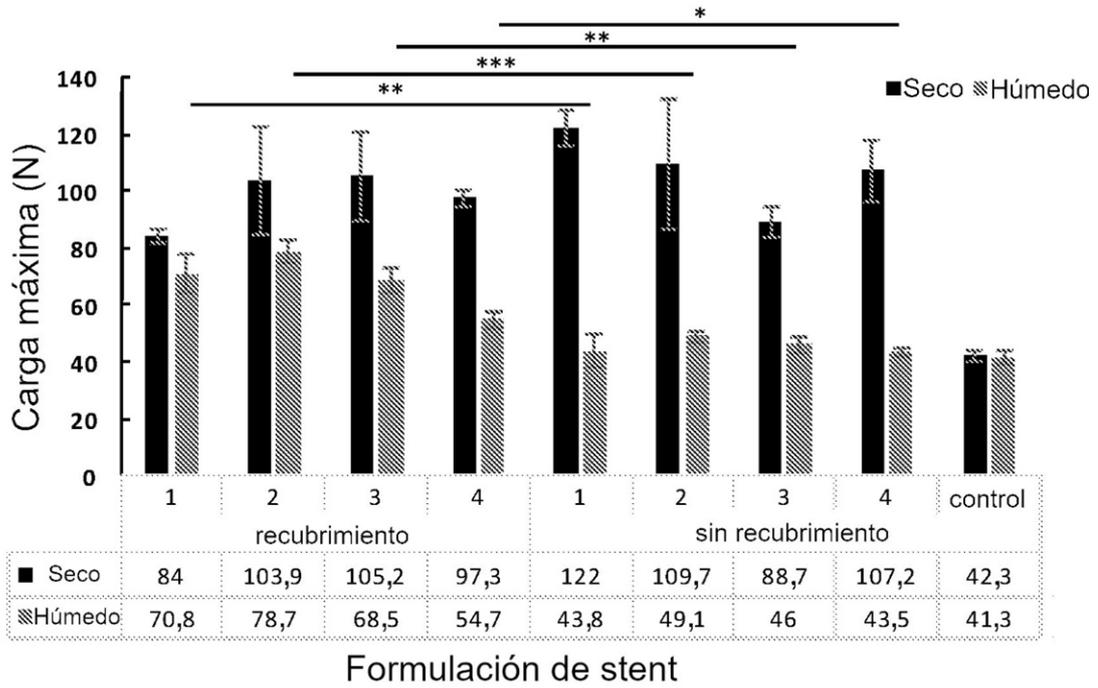


Fig. 6a

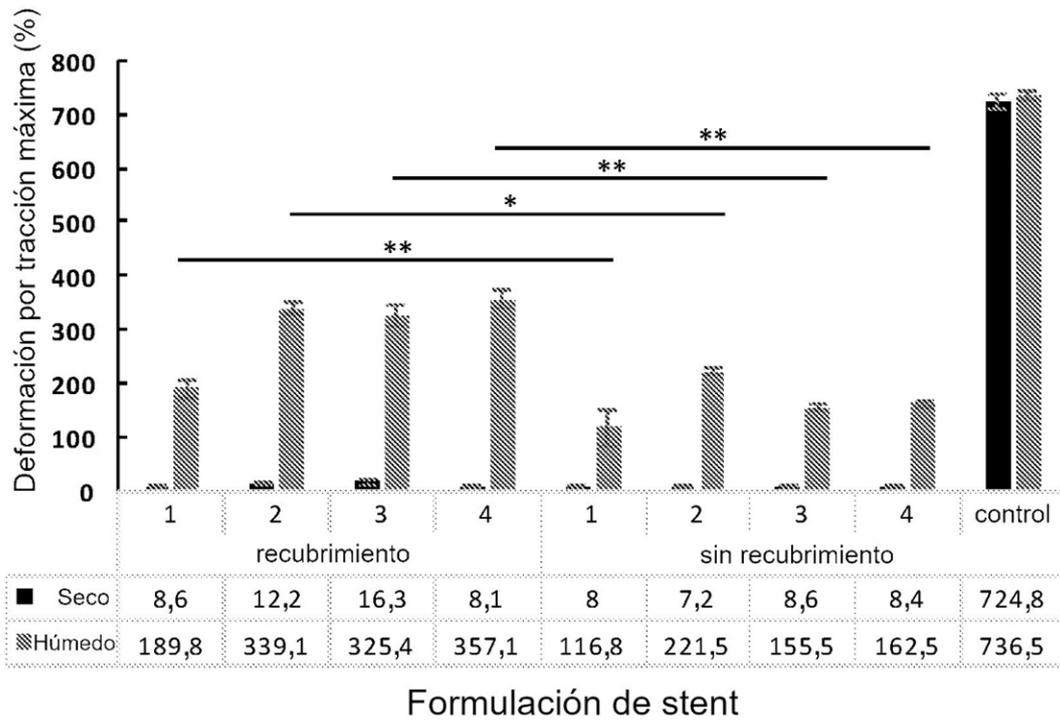


Fig. 6b

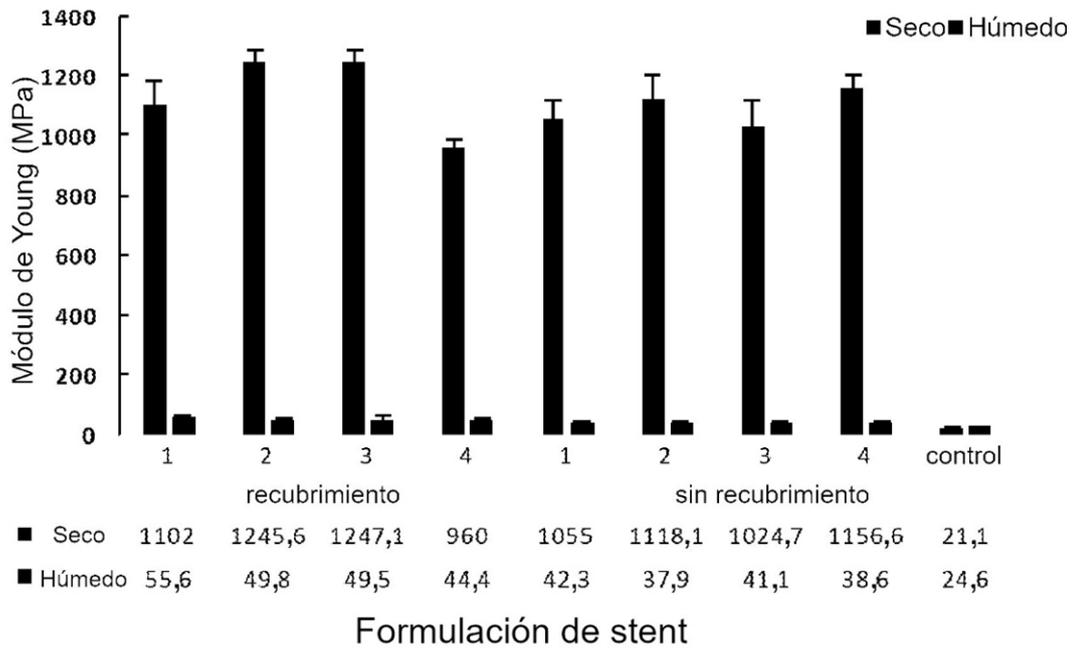


Fig. 6c

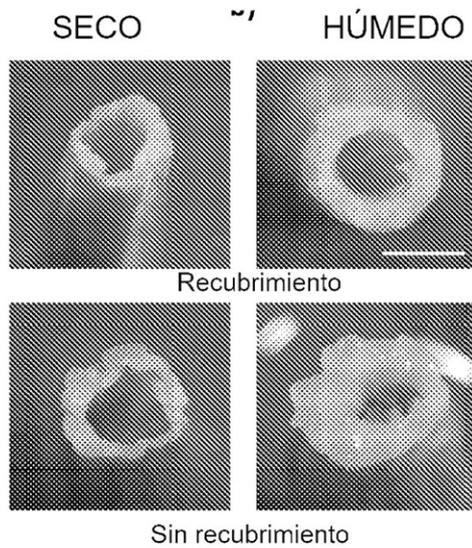
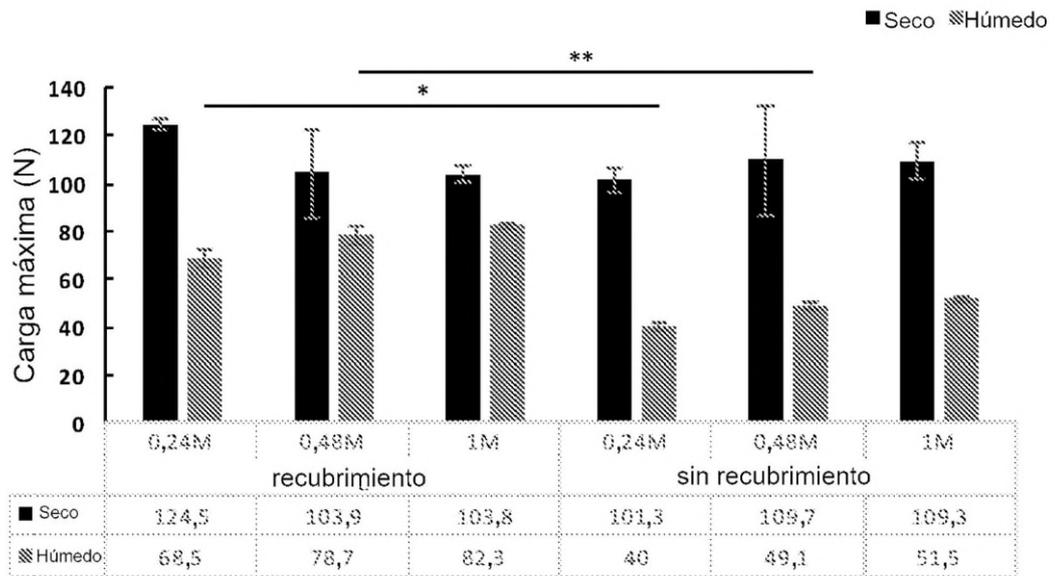
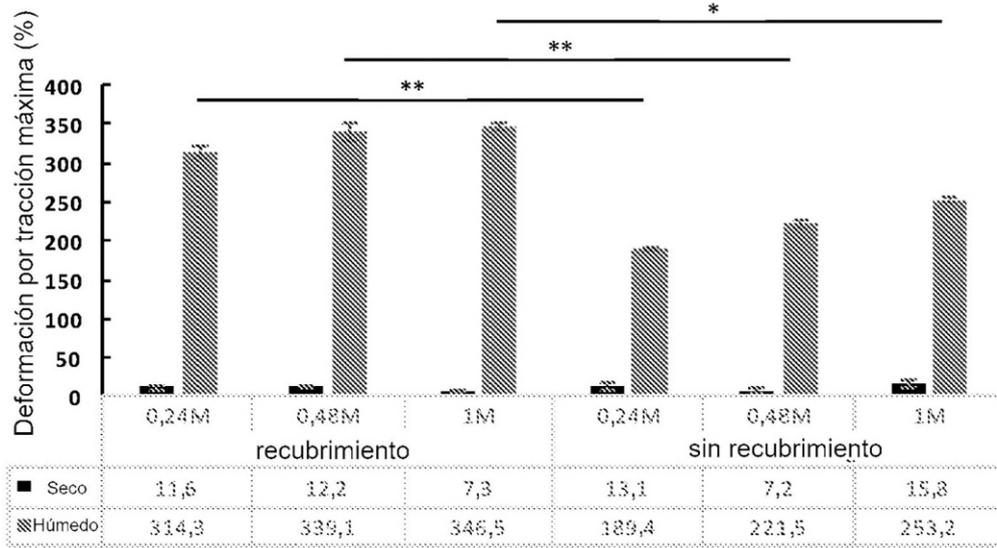


Fig. 6d



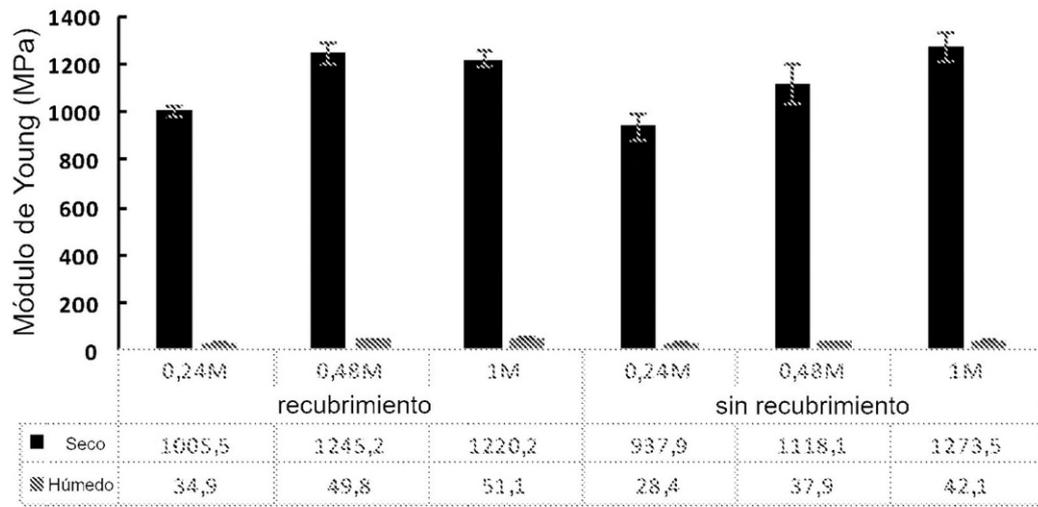
Formulación de stent

Fig. 7a



Formulación de stent

Fig. 7b



Formulación de stent

Fig. 7c

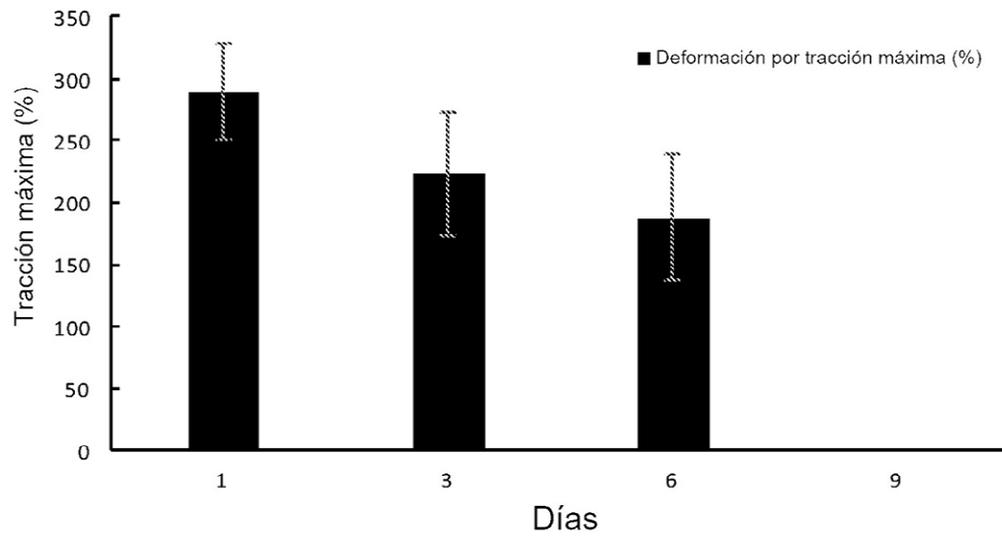


Fig. 7d

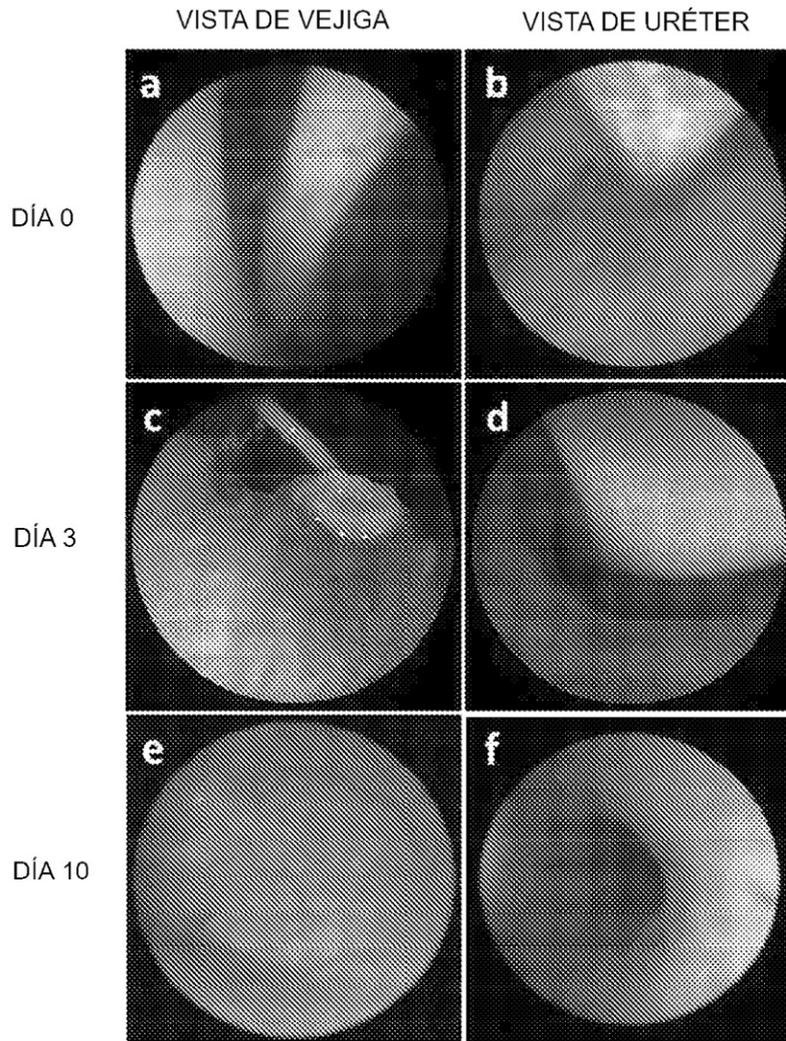


Fig. 8

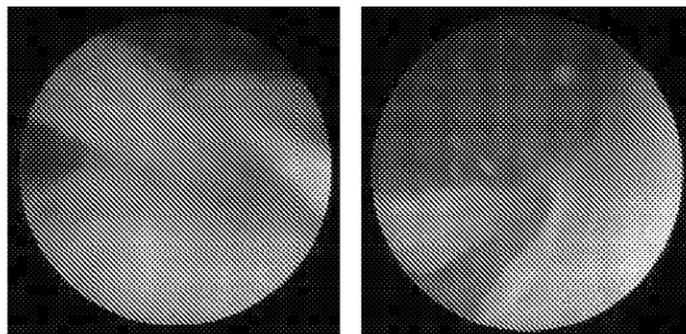


Fig. 9