

Deformaciones plásticas de matrices de submucosa intestinal porcina y su efecto en la orientación de las fibras de colágeno presentes en la matriz

Camilo José Hernández Toro (200925046)

Departamento de Ingeniería Biomédica
Universidad de los Andes
Bogotá D.C., Colombia
cj.hernandez55@uniandes.edu.co

Resumen—La baja disponibilidad de donantes de órganos lleva a los pacientes a estar en extensas listas de espera, pero esto no garantiza la recepción del órgano necesario para el tratamiento del paciente. La medicina regenerativa es un tratamiento alternativo y esta opción no depende de disponibilidad de donantes del órgano requerido. La submucosa intestinal porcina (SIS) es un andamio descelularizado ampliamente usado en medicina regenerativa y estudios recientes buscan cómo controlar la orientación de las fibras presentes en la matriz para lograr darle a los poros presentes en la matriz una geometría que fomente la regeneración tisular. En este estudio se evaluó la posible dependencia del ángulo de las fibras ante una deformación de 30 % durante el secado de láminas de SIS. Se realizaron ensayos de deformación durante el secado en 4 probetas, registrando el porcentaje de deformación final en 3 de estas, y se secaron 4 probetas sin ser deformadas como control. Luego se tomaron imágenes de cada una de las probetas, después de ser secadas, con microscopía electrónica de barrido a tres aumentos diferentes (150 X, 500 X y 1000 X) y mediante el análisis de estas imágenes se estimó el ángulo de las fibras presentes en ellas. Después del secado las 3 probetas analizadas mantuvieron un porcentaje de deformación cercano al 30 % deseado. Se encontró que en general el valor que toman los ángulos de las fibras es menor cuando las probetas fueron sometidas a ensayos de deformación y la variabilidad de dicho ángulo también disminuye. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en las imágenes tomadas a 500 X y a 150 X, pero no en el grupo de 1000 X. La deformación plástica de la SIS a lo largo del eje longitudinal del intestino puede otorgarle a los poros presentes en la matriz una geometría más adecuada para que el andamio guíe la regeneración tisular al orientar las fibras de colágeno sobre el eje longitudinal del intestino.

Palabras Clave— *Submucosa intestinal porcina; descelularización; deformación plástica; microscopía electrónica de barrido.*

I. INTRODUCCIÓN

A. Medicina regenerativa

En Colombia, cada vez más ciudadanos requieren de un trasplante para seguir viviendo o mejorar su calidad de vida. Pero, debido a la baja disponibilidad de donantes de órganos, los pacientes deben estar en extensas listas de espera para obtener el

trasplante que requieren [1]. Lamentablemente, estar en este tipo de listas no garantiza que el paciente reciba el trasplante a tiempo: durante el 2014, de los 2179 pacientes que se encontraban en lista de espera para un trasplante de algún órgano, sólo 1046 recibieron el trasplante que necesitaban [1].

Todavía es muy difícil lograr que los aloinjertos (provenientes de otro individuo de la misma especie) sean del todo eficientes debido a que pueden surgir complicaciones como problemas de histocompatibilidad, puede aumentar el riesgo de infección, incluso puede ocurrir la transmisión de enfermedades virales y/o el desarrollo de tumores [2]. Debido a estas complicaciones y a la baja disponibilidad de donantes de órganos se han desarrollado otros posibles tratamientos. Entre estos se encuentran los autoinjertos (provenientes del mismo paciente), el reemplazo del tejido por materiales sintéticos y la medicina regenerativa [3].

Las diferentes opciones mencionadas tienen problemas propios que deben ser considerados durante el tratamiento de los pacientes. Los autoinjertos no siempre están en las condiciones apropiadas para ser utilizados, pueden no cumplir con las características necesarias, como forma o tamaño, y causan morbilidad en el sitio de donde se extraen del paciente [2]. Por otro lado, algunos materiales sintéticos pueden causar complicaciones en el paciente, como generación de trombos [3], inflamación, fibrosis y pueden dejar al paciente susceptible ante infecciones [4], por lo que la medicina regenerativa está siendo un área de investigación muy activa.

En la medicina regenerativa, o ingeniería de tejidos, se usan andamios, células y moléculas biológicamente activas para generar tejidos funcionales. Esta área de la ingeniería biomédica busca generar constructos que logren restaurar, mantener o mejorar tejidos dañados u órganos completos [4]. Una de las primeras etapas de desarrollo del constructo es el diseño del andamio que sostendrá las células. Este puede ser construido a partir de diferentes tipos de materiales, como sintéticos o biológicos, y las propiedades que este andamio tenga van a tener un efecto sobre la respuesta biológica del mismo al ser implantado *in vivo* [5].

Una propiedad importante en los andamios celulares es poder brindarle a las células información espacial que les

permita ordenarse de forma adecuada para fomentar la regeneración tisular [6]. Si los andamios celulares tienen propiedades que muestran anisotropía estas les sirven a las células como una fuente de información espacial, y una de estas propiedades es la orientación de las fibras del andamio [6]. La orientación de dichas fibras le permite al tejido que crecerá en dicho andamio tener direccionalidad [6]. Además, las propiedades mecánicas del andamio son dependientes de la orientación en la cual estén las fibras con respecto a la dirección en la cual se aplica la fuerza [7], y lograr controlar la direccionalidad de las fibras podría determinar en parte la respuesta ante esfuerzos mecánicos de dicho andamio.

La geometría de los poros va a estar determinada por la orientación que tengan las fibras. Estos en general tendrán una forma similar a un paralelogramo, sobre todo similar a rombos [8] y se ha demostrado que cuando los poros tienen una forma más alargada, que se consigue cuando las fibras tienen un ángulo de orientación menor, el andamio es más efectivo para guiar la regeneración tisular [9].

Los andamios usados en medicina regenerativa pueden estar hechos de 3 tipos de materiales diferentes: materiales sintéticos, materiales provenientes de una fuente biológica y andamios biológicos descelularizados [10]. En la producción de andamios a partir de polímeros sintéticos se puede controlar la mayoría de las características físicas del andamio, pero, al trabajar con materiales biológicos, sobre todo los andamios descelularizados que ya tienen intrínsecamente dichas propiedades, la modificación de estas características es más difícil [4].

B. Submucosa intestinal porcina (SIS)

La producción de andamios descelularizados puede hacerse a partir de tejido de mamífero, y uno de los andamios más comúnmente usados proviene del intestino delgado porcino. Este material está compuesto por la submucosa del intestino delgado porcino descelularizada y se conoce por sus siglas en inglés (Small Intestine Submucosa) como SIS [4]. La SIS es principalmente una malla de colágeno tipo I pero también tiene colágeno tipo III, IV y VI [11] entrecruzado y esta malla muestra anisotropía en su estructura [12]. Las fibras de colágeno presentes en dicha malla tienen una organización característica que está relacionada con su función *in vivo*. Dichas fibras tienen una orientación predilecta a lo largo del eje longitudinal del intestino, y la mayoría de estas fibras tienen ángulos de alrededor 30° con respecto al eje longitudinal del intestino [13].

Este material suele tener unos 100 µm de espesor y suele considerarse un andamio 2D más que uno 3D [4]. Debido a sus propiedades mecánicas la SIS suele usarse en la regeneración de tejidos blandos y no es tan comúnmente usada en regeneración tisular en ambientes donde pueda estar siendo sometida a altas tasas de deformación [14]. La SIS conserva factores bioactivos, como glicoproteínas, glicosaminoglicanos y factores de crecimiento [15], que tienen propiedades angiogénicas y fomentan el crecimiento del tejido [4].

La SIS tiene un amplio rango de aplicación en medicina regenerativa, siendo utilizada tanto en estudios *in-vitro* como *in-vivo* [4]. Las principales aplicaciones que se están estudiando de SIS en un contexto *in-vivo* son en reemplazo de vasos sanguíneos, válvulas venosas, vejiga, secciones del intestino

delgado y grueso, esófago, ligamentos y músculos [4]. Las aplicaciones *in-vitro* más estudiadas son similares a las *in-vivo* pero abarcan más tipos de tejidos blandos [4].

El control de la orientación de las fibras de colágeno de la SIS puede ayudar a aumentar la eficiencia de los injertos realizados con este material, y podría permitir su uso en diferentes aplicaciones que requieren diferentes orientaciones de fibras o diferentes propiedades mecánicas.

C. Antecedentes

Cumplir con las especificaciones precisas de la orientación de las fibras es todavía un reto importante en la construcción de andamios para su uso en medicina regenerativa [16]. Esta es una de las principales desventajas del uso de materiales provenientes de fuentes biológicas, dado que el control de las propiedades del material es más complejo que con materiales sintéticos [17], ya que estos últimos pueden fabricarse utilizando diferentes técnicas que permiten controlar más fácilmente las propiedades finales del material [5].

Por esto hay un gran interés en encontrar métodos estandarizados para la generación de andamios de origen biológico, como por ejemplo la SIS descelularizada, con las especificaciones necesarias para tener un buen desempeño en la aplicación deseada [4].

Estudios anteriores han demostrado que la aplicación de fuerzas de elongación sobre diferentes andamios logra afectar tanto la organización del andamio como las propiedades mecánicas del mismo [18]. Otro método que se ha utilizado para orientar fibras de colágeno utiliza un campo magnético para manipular la orientación de dichas fibras de forma controlada [19].

En un estudio realizado por Sánchez-Palencia y col. [20], se demostró que los parámetros de fabricación de la SIS afectan directamente la probabilidad de éxito de injertos realizados con este material. Ellos examinaron el efecto de dos parámetros principales: la remoción o no remoción de una capa de colágeno denso presente en la SIS y el estado final de hidratación de la SIS y evaluaron el microambiente mecánico que la SIS con los diferentes parámetros de fabricación ofrecía a las células. Los autores concluyeron que el parámetro de estado de hidratación tiene un efecto significativo sobre el microambiente mecánico que la SIS provee, y este es dependiente de la orientación que tienen las fibras [4] pero la presencia o ausencia de la capa de colágeno denso no tiene un efecto significativo sobre dicho microambiente.

En una tesis realizada por Pérez-Leiva [21] en la Universidad de los Andes se efectuaron ensayos de deformación plástica en probetas de la SIS humedecidas con el fin de controlar la orientación de las fibras y modificar la geometría de los poros. Después de evaluar las probetas deformadas con un microscopio electrónico de barrido no encontró una relación clara entre el porcentaje de deformación de las probetas de la SIS y la orientación de las fibras en la matriz de colágeno.

En este estudio se busca determinar si al someter láminas de SIS a eventos de deformación plástica durante su secado se logra orientar las fibras de colágeno presentes en el andamio.

II. METODOLOGÍA

A. Obtención de intestino delgado porcino y preparación de la submucosa intestinal (SIS)

Las muestras del intestino delgado porcino se obtuvieron pocas horas después de la muerte del animal para reducir el efecto de la descomposición del órgano. Las muestras fueron lavadas de inmediato para remover residuos presentes en el lumen del intestino que pueden deteriorar el material. Se removieron regiones altamente vascularizadas y agregados linfoides presentes en la submucosa, como lo son las placas de Peyer [22][22], debido a que la matriz extracelular en estas regiones es diferente a la del resto de la submucosa. El intestino fue cortado en secciones longitudinales de alrededor de 30cm de largo y almacenado congelado hasta que se realizó la preparación de la SIS.

La preparación de la SIS se realizó siguiendo la metodología estandarizada utilizada en la Universidad de los Andes para la descelularización de intestino porcino. Este procedimiento consiste en una remoción mecánica seguida por una serie de baños con diferentes soluciones en un medio estéril. Durante la remoción mecánica se remueven las capas de la túnica mucosa, la muscularis externa y la túnica serosa del intestino de un modo similar al realizado por Sánchez-Palencia y col. [20]. Luego del raspado se realizó una serie de lavados con agua, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno y tampón fosfato salino (PBS) en un medio estéril. La SIS resultante fue almacenada en agua destilada estéril a 4 °C.

B. Deformaciones plásticas

Se realizaron ensayos de tensión uniaxiales en la dirección del eje longitudinal del intestino. Las deformaciones se realizaron utilizando la Bose Electroforce Planar Biaxial Testbench y se utilizaron probetas de 25 mm de largo por 15 mm de ancho de SIS. En los extremos del sentido longitudinal las probetas fueron montadas sobre papel de lija con cianocrilato y estas fueron sostenidas con mordazas a presión permitiendo que la carga ejercida sobre las probetas se distribuyera de manera uniforme por toda el área transversal de estas, evitando que se generen puntos donde se concentre la carga [23]. Para las deformaciones se utilizaron 4 probetas y estas fueron sometidas a un protocolo que inicia con una función rampa (0.1 mm/s) que abarca una distancia de 10 mm. Se monitoreó a través de deformación óptica el porcentaje de deformación real de la probeta utilizando marcadores sobre el lado abluminal de la SIS y cuando el porcentaje de deformación alcanzaba un valor de 30 % se mantenían las condiciones actuales del equipo y se dejaba en esta posición por 12 horas. Se registró el porcentaje de deformación real, la carga y el espesor de las probetas mientras se llegaba al porcentaje de deformación deseado para 3 de las probetas y se registró el porcentaje de deformación final que estas tenían luego del tiempo de secado. Como control se secaron 4 probetas por 12 horas sin ser sometidas al ensayo de deformación.

C. Toma de Imágenes por Microscopía Electrónica de Barrido

Luego de realizar los ensayos de deformación se tomaron imágenes por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La toma de imágenes se realizó con el microscopio JEOL, modelo

JSM 6490 (en alto vacío) a 20 kV. Las probetas secas fueron previamente recubiertas con oro para su visualización en el microscopio. Se tomaron tres imágenes con diferente aumento por cada probeta: 150 X, 500 X y 1000 X que son similares a aumentos que se han usado en otros estudios [24, 25]. Las imágenes fueron tomadas en regiones lo más homogéneas posibles dentro de la región donde se encontraban los marcadores usados en el monitoreo de la deformación óptica. Todas las imágenes fueron tomadas del lado luminal de la SIS, esto con el fin de reducir la variabilidad que existe en la estructura de la red de colágeno de la SIS entre el lado luminal y abluminal [26]. El contraste de las imágenes se ajustaba utilizando un modo de observación de baja resolución y al tomar las imágenes se ajustaba el microscopio a un modo de mayor resolución.

D. Análisis de Imágenes

1) Acondicionamiento de las imágenes

El análisis de las imágenes tomadas en el SEM se realizó con el software Matlab® y para el acondicionamiento se realizó un algoritmo similar al propuesto por D'Amore y col. [27]. Primero se separó la barra de referencia de la imagen como tal, luego se hizo una ecualización del histograma de la imagen seguido por un filtrado con un filtro mediano de 3 por 3. Después se hizo una umbralización local siguiendo el método de Otsu, que resulta en una representación binaria de la imagen. Luego se realizó una serie de operaciones morfológicas utilizando elementos estructurantes (ELES) diferentes creados con la función *strel* de MATLAB®:

a) *Clausura*: con un ELES de 5 x 5 (función *imclose* de MATLAB®).

b) *Erosión*: con un ELES de 3 x 3 con 4-vecinos (función *imerode* de MATLAB®).

c) *Apertura*: con un ELES de 3 x 3 con 4-vecinos (función *imopen* de MATLAB®).

d) *Dilatación*: con un ELES de 5 x 5 con 12-vecinos (función *imdilate* de MATLAB®).

e) *Erosión*: con un ELES de 3 x 3 con 4-vecinos (función *imerode* de MATLAB®).

f) *Dilatación Geodésica*: con un ELES de 3 x 3 y marcadores en las posiciones en el borde de la imagen donde la imagen resultante del paso anterior tomaba valores de 1. Esto permitió remover elementos que no estaban conectados a la red de fibras extraída.

g) *Esqueletización*: utilizando la función *bwmorph* de MATLAB® con el parámetro *skel*.

El código para el acondicionamiento se muestra en el Anexo A.

2) Ángulo de las fibras

Para estimar el ángulo de las fibras presentes en las imágenes para cada tratamiento se utilizó la imagen esqueletizada. Primero se calculó el gradiente de la imagen esqueleto con la función *imgradient*, y esta función permite calcular la orientación del gradiente de la imagen que es perpendicular a la dirección de la fibra. Con la orientación del gradiente se obtuvo

la orientación de las fibras al tomar la dirección perpendicular al gradiente (sumando 90°). Siempre se tomó el ángulo interior de la fibra con respecto al eje horizontal y esto permite hallar el ángulo que tienen las fibras con respecto a la dirección en la cual se efectuó la deformación, es decir con respecto al eje horizontal en las imágenes del SEM.

E. Análisis Estadísticos

El análisis estadístico se realizó de forma independiente para cada uno de los grupos de imágenes según su aumento (150 X, 500 X y 1000 X).

Debido a la no normalidad de la distribución los ángulos de las fibras (Shapiro-Wilk $p < 0.01$ para los dos tratamientos en los 3 grupos de imágenes) para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se utilizaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney (MW) y de Kolmogorov-Smirnov (KS). Se escogió la prueba a usar en cada grupo de imágenes según su aumento dependiendo del resultado obtenido al realizar una comparación de las varianzas entre los tratamientos por medio de una prueba de Levene no paramétrica (NPL) [28]. Si se podía asumir que las varianzas de los dos tratamientos eran similares se utilizaba la prueba de MW,

de lo contrario se utilizaba la prueba de KS. Para los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS® y una significancia de $p = 0.05$.

III. RESULTADOS

A. Deformaciones plásticas

Las 3 probetas analizadas tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la tensión requerida para llegar a una deformación de 30 % (ver Fig. 2). Los espesores de las probetas usadas fueron 0.045 mm, 0.050 mm y 0.051 mm para las réplicas 1, 2 y 3 respectivamente. Luego de las 12 horas de secado los porcentajes de deformación de las tres probetas fueron de 31.6 %, 30.3 % y 29.8 % para las réplicas 1, 2 y 3 respectivamente.

B. Acondicionamiento de las imágenes

Debido a que las probetas no eran totalmente planas había diferentes capas de fibras de colágeno. Durante el acondicionamiento de las imágenes se modificaba la imagen inicial para resaltar la red de fibras de colágeno más superficial. Las imágenes resultantes de los pasos principales del acondicionamiento se muestran en la Fig. 1.

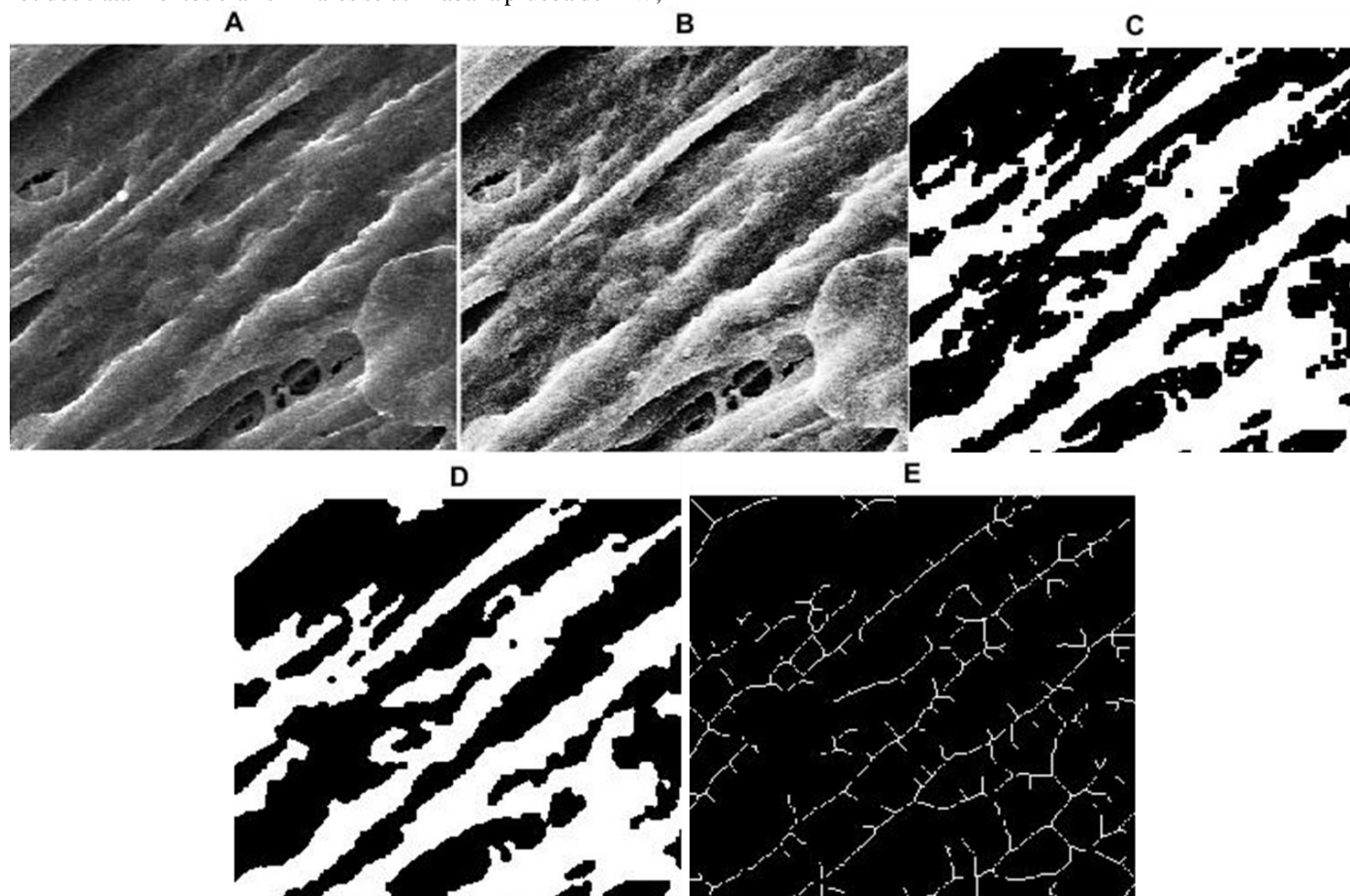


Fig. 1. Resultado de cada paso del acondicionamiento en una imagen utilizada en este estudio (se muestra la misma región de la imagen). A: Imagen Original. B: Imagen después de realizarse la ecualización del histograma. C: Imagen umbralizada por el método de Otsu. D: Imagen después de las operaciones morfológicas. E: Imagen esquelizada.

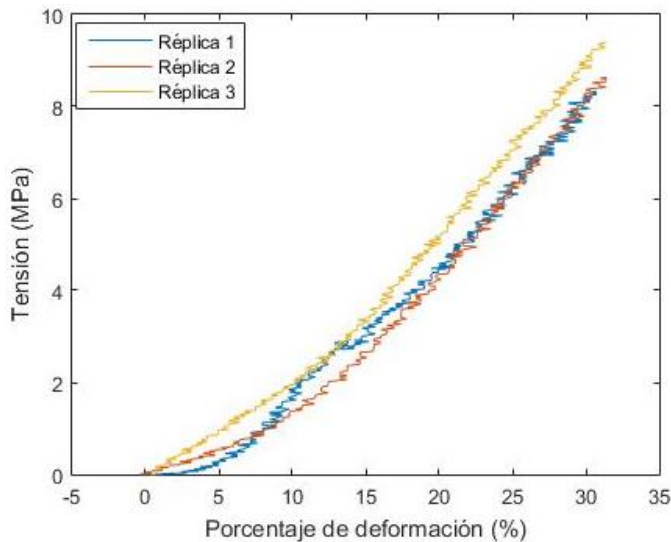


Fig. 2: Ensayo de tensión con probetas de SIS. Se muestra los resultados del ensayo de tensión hasta que la probeta de SIS alcanza un porcentaje de deformación real del 30 %.

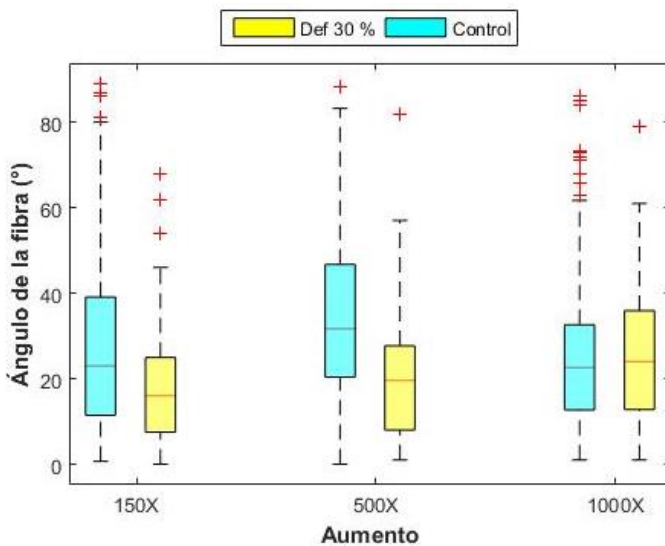


Fig. 3: Ángulo de las fibras. Se muestra la distribución de los ángulos de las fibras para cada tratamiento para los tres grupos de imágenes según su aumento. Las medianas de los tratamientos de control y de deformación respectivamente son 23.0° y 16.0° para las imágenes a 150 X; 31.7° y 19.6° para las imágenes a 500 X; 22.6° y 24.0° para las imágenes a 1000 X.

C. Ángulo de las fibras

El ángulo de las fibras de colágeno fue estimado siguiendo el algoritmo propuesto. Para los grupos de imágenes tomadas a 150 X y 500 X la mediana del ángulo fue menor en el tratamiento de deformación que en el de control. Además, el rango intercuartílico (diferencia entre el primer y tercer cuartil) en el tratamiento de deformación (17.5° para 150 X y 19.7° para 500 X) fue menor que en el tratamiento control (27.6° para 150 X y 26.4° para 500 X) y el rango total que abarcan los ángulos en los tratamientos de deformación fue menor que en los tratamientos de control (ver Fig. 3).

Por otro lado, en el grupo de imágenes tomadas a 1000X las medianas del ángulo para ambos tratamientos fueron muy

similares. Además, tanto el rango intercuartílico (19.9° para el tratamiento de control y 23.1° para el tratamiento de deformación) como el rango total abarcado por los ángulos en ambos grupos también fueron similares (ver Fig. 3).

Para el grupo de imágenes que fueron tomadas a 150 X se utilizó la prueba KS para determinar si había diferencias en la distribución de los ángulos entre los dos tratamientos, ya que la prueba de NPL arrojó un valor de significancia $p = 0.007$, lo que impidió asumir que las varianzas eran iguales entre los tratamientos. Para comparar los dos tratamientos en los grupos de imágenes tomadas a 500 X y 1000 X se utilizó la prueba de MW, debido a que la prueba NPL arrojó valores de significancia $p = 0.111$ y $p = 0.629$ para 500 X y 1000 X respectivamente, lo que permitió asumir que las varianzas eran iguales entre los tratamientos.

En las imágenes tomadas a 150 X, luego de realizar la prueba KS, se encontraron diferencias significativas en la distribución de los ángulos entre las muestras ($p = 0.000$), lo que significa que existen diferencias en la distribución de los ángulos entre los dos tratamientos.

En las imágenes tomadas a 500 X, luego de realizar la prueba MW, se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los dos grupos ($p = 0.000$), entonces la mediana de los ángulos de las fibras en el tratamiento de deformación fue significativamente menor que la mediana de los ángulos de las fibras en el tratamiento control.

En las imágenes tomadas a 1000 X, luego de realizar la prueba de MW, no se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los dos grupos ($p = 0.871$).

IV. DISCUSIÓN

A. Deformaciones plásticas

Las tres réplicas de las que se registró la carga durante el ensayo de tensión hasta tener una deformación del 30 % tuvieron un comportamiento muy similar en su curva tensión-elongación (Fig. 2). Para llegar al 30 % de deformación las tres fueron sometidas a tensiones de entre 8-10 MPa. Anteriormente se encontró que la tensión máxima que puede soportar una única lámina de SIS en dirección longitudinal es de alrededor de 12 MPa [29]. En el presente estudio las tensiones a las que se llegó durante el ensayo de tensión fueron similares a este valor y esto podría indicar que la carga aplicada fue suficiente para que las probetas de SIS salieran de la región en la que siguen un comportamiento elástico y llegaron a tener una deformación plástica. Además, como después de las 12 horas de secado el porcentaje de deformación fue cercano al 30 % deseado, se puede afirmar que los cambios en la estructura de la red de fibras de colágeno de las probetas se mantuvieron incluso después de remover la carga ejercida sobre la probeta secada.

Un estudio realizado por Tottey y col. [30] muestra que existen diferencias significativas en las propiedades mecánicas, como el módulo de Young, de láminas de SIS que provienen de animales con diferentes edades. Además, Ashley y col. [31] encontraron que existen diferencias en las propiedades de láminas de SIS provenientes de diferentes regiones (proximal y distal) del intestino delgado porcino. Las similitudes en el comportamiento mecánico de las 3 probetas de SIS se deben a

que provienen del intestino de un mismo individuo y además se extrajeron de una misma sección del intestino.

B. Acondicionamiento de las imágenes

Luego del acondicionamiento de las imágenes tomadas por el SEM se pudo extraer la capa más superior de fibras de colágeno presente en la imagen, incluso cuando el contraste inicial entre las fibras y el fondo de la imagen era relativamente bajo. La remoción de la etiqueta puesta por el software de captura de imágenes permite ampliar el rango dinámico de la imagen y por consiguiente aumentar el contraste entre las fibras y el fondo de la imagen (Fig. 1. B). El método de umbralización de Otsu transforma la imagen de escala de gris a una imagen binaria, tomando un umbral que es dependiente del histograma de la imagen inicial, donde cualquier pixel que supere ese umbral tomará un valor de 1 y 0 si ocurre lo contrario [32]. Al observar la imagen en Fig. 1. C se puede apreciar que las regiones que quedan marcadas corresponden a las fibras que en un principio tenían una mayor intensidad y por esto son consideradas las más superficiales.

En la imagen resultante de la serie de operaciones morfológicas (Fig. 1 D) se removieron regiones que, luego de la umbralización, eran considerados como fibras superficiales de la matriz pero estas no estaban conectadas con la red de fibras más superficial. Esta remoción permite que la red de fibras más superficial se diferencie mejor del resto de la imagen.

La imagen del esqueleto de las fibras (Fig. 1. E) permite observar la dirección general de las fibras sin importar el diámetro que estas tienen, evitando que se sobrestime el número de fibras con cierta orientación debido al diámetro que estas tienen.

Las imágenes de SEM ofrecen una alta resolución en el plano que se toma la imagen, pero brindan información limitada de la profundidad de las fibras [27]. Esto puede llevar a que durante el acondicionamiento se asuma que fibras que se encuentran a profundidades diferentes sean agrupadas en una misma capa, sobrestimando el número de fibras presentes en la capa superficial de las probetas de SIS. Además, si hay grupos de fibras muy cercanos entre sí, la agrupación que realiza el algoritmo usado podría juntarlas y considerarlas como una única fibra. Esta agrupación errónea podría resultar en una subestimación del número de fibras que tiene cierta orientación.

En algunos estudios como los realizados por Luo y col. [24] y Syed y col. [25] la toma de imágenes en el SEM se hizo con aumentos de entre 500 X y 1000 X, como se hizo en este estudio, pero en otros estudios, como los realizados por Sanchez-Palencia y col. [20] y D'Amore y col. [27] tomaron las imágenes en el SEM con aumentos de 3500 X. Esto evidencia que todavía no hay un acuerdo sobre cuál debe ser el aumento a ser usado para analizar la estructura microscópica de andamios descelularizados como la SIS. Además, en un estudio realizado por Liu y col. [33] los autores describen un fenómeno que ellos llaman efecto de magnificación, en el cual el aumento con el que es tomada la imagen utilizando el SEM afecta los resultados provenientes de dichas imágenes debido a la estructura jerárquica del material, donde patrones que pueden estar presentes en un aumento no son evidentes en otros. Debido a que la SIS tiene una estructura jerárquica [34] el efecto de

magnificación puede hacer que la significancia de algunas fibras presentes en la matriz de SIS varíe dependiendo del aumento usado durante la toma de la imagen. Este fenómeno podría explicar los diferentes resultados obtenidos en cada grupo de imágenes según el aumento con el que fueron tomadas.

C. Ángulo de las fibras

La mediana del ángulo de las fibras tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para los grupos de imágenes a 150 X y 500 X, siendo menor en el tratamiento de deformación. Además, el rango intercuartílico y el rango total de los ángulos en los tratamientos de deformación fueron menores que en los controles en los grupos de imágenes de 150 X y 500 X. Esto último significa que la variabilidad de los valores de los ángulos en el tratamiento de deformación fue menor. Esto concuerda con los hallazgos publicados por Badylak y col. [7] quienes vieron que el grado de alineamiento de las fibras cambia cuando la matriz extracelular es sometida a cargas, y estas fibras se orientan hacia la dirección en la cual se ejerce la carga. Se ha encontrado que esta orientación es reversible [31], pero se puede lograr que esta rotación de las fibras sea permanente, llegando a cambiar las propiedades mecánicas de la matriz [7]. La disminución en el ángulo de las fibras resulta en que los poros presentes en la matriz, que se consideran como cuadriláteros, tengan una forma alargada más adecuada para que el andamio guíe de mejor manera la regeneración tisular [9].

Al mirar en los grupos de imágenes a 150 X y 500 X las medianas de los ángulos para el tratamiento de control se observa que estas tuvieron valores más cercanos 30° que las medianas del tratamiento de deformación (ver Fig. 3). Esta cercanía al ángulo de 30° concuerda con lo que se ha reportado como la dirección predilecta de las fibras de colágeno en la submucosa *in vivo* [13]. Lo anteriormente mencionado no ocurre en el grupo de imágenes a 1000 X, donde las dos medianas del ángulo en los tratamientos se asemejan entre sí. La diferencia entre la tendencia central hallada en este estudio y la reportada en la literatura se puede deber a la variación que existe en las propiedades de los materiales biológicos y de los andamios biológicos descelularizados [7].

El secado de la SIS causa que las fibras colapsen entre sí, cerrando los poros presentes en la matriz y esto puede afectar la adhesión e infiltración celular, además de la tasa de degradación del andamio *in vitro* e *in vivo* [35]. Pero, el secado permite manipular más fácilmente el material, además de disminuir la ductilidad del mismo [36]. El procesamiento que se realizó con el material en este estudio no será el apropiado para todas las posibles aplicaciones de SIS, debido a las diferencias que existen en las propiedades de la SIS seca e hidratada [20]. Es necesario estudiar las características finales del material y la respuesta que pueden tener diferentes tipos celulares en la SIS después de los posibles procesamientos para conocer cuáles son las propiedades ideales para cada aplicación y encontrar el procesamiento ideal para obtener dichas propiedades.

D. Conclusiones

El uso de imágenes de SEM es una aproximación que permite obtener imágenes con una alta resolución en el plano del que se toma la imagen, pero para obtener mejores estimaciones de la orientación de las fibras sería conveniente utilizar un

método de toma de imágenes que brinde más información tridimensional sobre la estructura del andamio. Otras técnicas como el uso del microscopio confocal o la microscopía de fluorescencia pueden proveer mayor información tridimensional del andamio.

Es necesario determinar el aumento en el que las propiedades estimadas por medio del análisis de imágenes se asemejen a los valores reales medidos por otros métodos experimentales ya que el efecto de magnificación puede afectar los resultados al analizar un material con una estructura jerarquizada, como lo es la SIS. Se propone que el aumento que se debe usar para la estimación de la orientación de las fibras siguiendo el método utilizado en este estudio es de 500 X.

Al deformar plásticamente la SIS durante el secado de las láminas se puede orientar las fibras presentes en la matriz. El estudio del efecto que pueden tener diferentes porcentajes de deformación durante el secado de las probetas de SIS es importante para determinar si se pueden obtener diferentes grados de orientación de las fibras hacia la dirección en la que se realice dicha deformación.

Al utilizar SIS proveniente de un mismo lote las propiedades mecánicas de las probetas serán muy similares, lo que facilita la realización de ensayos de deformación ya que se espera que el comportamiento sea muy similar entre las muestras y facilita la estandarización de un protocolo de procesamiento del material. Pero, de todas formas, los materiales biológicos y los andamios biológicos descelularizados tienen una variabilidad propia que debe ser considerada en estudios futuros.

Los resultados de este estudio muestran que las deformaciones de probetas de SIS pueden llevar a que se dé una orientación de las fibras presentes en la matriz hacia la dirección en la que da la deformación. En estudios futuros para reducir el posible efecto de la variabilidad que tienen los andamios biológicos descelularizados en la orientación de las fibras, en estudios futuros se propone seguir un diseño experimental con bloqueo, donde la variable bloqueada sean las probetas individuales. Además, se debería evaluar el efecto que puede tener la rehidratación de la SIS en la orientación de las fibras, ya que al realizarse la implantación *in vivo* de la SIS el material es rehidratado, y así se conocerá las condiciones que brindará el andamio a las células *in vivo*.

ANEXOS

Anexo A: Código implementado en MATLAB®

```
function [ meanAngle, stdAngle ] =
PoreProcessingR( ima, f1, f2, c1, c2 )
%POREPROCESSING Procesamiento y
resultados de las imágenes del SEM

% Extracción de los elementos deseados de
la imagen
imagen=(ima(f1:f2,c1:c2));

% Procesamiento de la imagen (siguiendo
D'Amore et al., 2010)
imagenh=histeq(imagen);
imagenf=medfilt2(imagenh);
```

```
level=graythresh(imagenf);
imbw=im2bw(imagenf,level);
imbw=imclose(imbw,strel('disk',3));
RFD=6;
imaer=imerode(imbw,strel('disk',round(RFD
/6)));
imaopen=imopen(imaer,strel('disk',round(R
FD/6)));
imdil=imdilate(imaopen,strel('disk',round
(RFD/3)));
imer=imerode(imdil,strel('disk',round(RFD
/6)));
```

```
% Dilatación geodésica: remoción de los
objetos que no tocan el borde
```

```
% Marcadores en el borde
```

```
s=size(imer);
[fil,col]=find(imer==1);
bordef1=find(fil==1);
bordef2=find(fil==s(1));
bordec1=find(col==1);
bordec2=find(col==s(2));
newIm=zeros(s(1),s(2));
newIm(1,col(bordef1))=1;
newIm(end,col(bordef2))=1;
newIm(fil(bordec1),1)=1;
newIm(fil(bordec2),end)=1;
```

```
% Variables para la dilatación
```

```
tam=size(newIm);
eles=ones(3,3);
matrix=imer;
mat=newIm;
labels=zeros(tam(1),tam(2));
```

```
while 1
% Se encuentran las posiciones en las
hay unos en la imagen (donde hay
% componentes conexos)
[fil,col]=find(mat==1);
% Si no hay más componentes se acaba
el ciclo
if numel(fil)==0
break
end
imDil=zeros(tam(1),tam(2));
imDil(fil(1),col(1))=1;
dilation=1;
while dilation
imDil1=imdilate(imDil,eles);
imDil2=and(imDil1,matrix);
A=imDil-imDil2;
if max(abs(A(:)))==0
dilation=0;
end
imDil=imDil2;
end
labels=labels+imDil;
```

```

mat=mat-imDil;
end

imer=labels;
imskel=bwmorph(imer, 'skel', Inf); %
Esqueletización de la imagen

end

```

REFERENCIAS

- [1] Ministerio de Salud. (2015). Donación y trasplantes de órganos. Minsalud.gov.co. Recuperado el 19 de Mayo 2015, de: <http://www.minsalud.gov.co/salud/MT/Paginas/donacion-y-trasplantes-de-organos.aspx>
- [2] L. Nair and C. LaurencinK, "Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery", in *Tissue Engineering I Scaffold Systems for Tissue Engineering*, 1st ed., K. Lee and D. Kaplan, Ed. Berlin, 2006.
- [3] Y. Naito, T. Shinoka, D. Duncan, N. Hibino, D. Solomon, M. Cleary, A. Rathore, C. Fein, S. Church and C. Breuer, "Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 4-5, pp. 312-323, 2011.
- [4] B. Andrée, A. Bär, A. Haverich and A. Hilfiker, "Small Intestinal Submucosa Segments as Matrix for Tissue Engineering: Review", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 19, no. 4, pp. 279-291, 2013.
- [5] Y. Luo, G. Engelmayr, D. T. Auguste, L. da Silva Ferreira, J. M. Karp, R. Saigal and R. Langer, Chapter 24 - 3D Scaffolds, In *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, editado por Robert Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti, Academic Press, Boston, 2014, Páginas 475-494, ISBN 9780123983589
- [6] A. Bär, A. Haverich and A. Hilfiker, "Cardiac tissue engineering: 'reconstructing the motor of life'", *Scandinavian Journal of Surgery*, vol. 96, no. 154, 2007.
- [7] S. Badylak, D. Freytes and T. Gilbert, "Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function", *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 1, pp. 1-13, 2009.
- [8] M. Sacks, C. Chuong, W. Petroll, M. Kwan and C. Halberstadt, "Collagen Fiber Architecture of a Cultured Dermal Tissue", *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 119, no. 1, p. 124, 1997.
- [9] G. Engelmayr, G. Papworth, S. Watkins, J. Mayer and M. Sacks, "Guidance of engineered tissue collagen orientation by large-scale scaffold microstructures", *Journal of Biomechanics*, vol. 39, no. 10, pp. 1819-1831, 2006.
- [10] J. Hodde, "Naturally Occurring Scaffolds for Soft Tissue Repair and Regeneration", *Tissue Engineering*, vol. 8, no. 2, pp. 295-308, 2002.
- [11] L. Shi, and V. Ronfard. "Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review". *International Journal of Burns and Trauma*, vol. 3, no. 4, pp. 173-179, 2013.
- [12] M. Sacks and D. Gloeckner, "Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 46, no. 1, pp. 1-10, 1999.
- [13] J. Obermiller, J. Hodde, C. McAlexander, K. Kokini and S. Badylak, "A comparison of suture retention strengths for three biomaterials", *Med Sci Monit*, vol. 10, 2004.
- [14] L. Pu, "Small Intestinal Submucosa (Surgisis) as a Bioactive Prosthetic Material for Repair of Abdominal Wall Fascial Defect", *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 115, no. 7, pp. 2127-2131, 2005.
- [15] L. Kokai, Y. Lin, N. Oyster and K. Marra, "Diffusion of soluble factors through degradable polymer nerve guides: Controlling manufacturing parameters", *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 7, pp. 2540-2550, 2009.
- [16] P. Quadrani, A. Pasini, M. Mattioli-Belmonte, C. Zannoni, A. Tampieri, E. Landi, F. Giantomassi, D. Natali, F. Casali, G. Biagini and A. Tomei-Minardi, "High-resolution 3D scaffold model for engineered tissue fabrication using a rapid prototyping technique", *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 43, no. 2, pp. 196-199, 2005.
- [17] L. Moroni, J. de Wijn and C. van Blitterswijk, "3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties", *Biomaterials*, vol. 27, no. 7, pp. 974-985, 2006.
- [18] L. Niklason, "Functional Arteries Grown in Vitro", *Science*, vol. 284, no. 5413, pp. 489-493, 1999.
- [19] R. Tranquillo, T. Girton, B. Bromberek, T. Tribes and D. Mooradian, "Magnetically orientated tissue-equivalent tubes: application to a circumferentially orientated media-equivalent", *Biomaterials*, vol. 17, no. 3, pp. 349-357, 1996.
- [20] D. Sánchez-Palencia, A. D'Amore, A. González-Mancera, W. Wagner and J. Briceño, "Effects of fabrication on the mechanics, microstructure and micromechanical environment of small intestinal submucosa scaffolds for vascular tissue engineering", *Journal of Biomechanics*, vol. 47, no. 11, pp. 2766-2773, 2014.
- [21] C. Pérez Leiva, J.C. Briceño Triana & J.E. Medina. Evaluación microscópica sobre la variación en la porosidad y orientación de las fibras de colágeno, en una matriz de submucosa intestinal porcina sometida a esfuerzos mecánicos de tracción. Bogotá: Uniandes, 2011.
- [22] S. Paxton, A. Knibbs and M. Peckham, "The Leeds Histology Guide", *Histology.leeds.ac.uk*, 2003. [Online]. Disponible: http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/small_intestine.php. [Recuperado: 08- Jan- 2016].
- [23] J. Delgadillo, S. Delorme, F. Thibault, R. DiRaddo and S. Hatzikiriakos, "Large Deformation Characterization of Porcine Thoracic Aortas: Inverse Modeling Fitting of Uniaxial and Biaxial Tests", *Journal of Biomedical Science and Engineering*, vol. 08, no. 10, pp. 717-732, 2015.
- [24] J. Luo, W. Chen, X. Chen, T. Qin, Y. Huang, H. Xie, X. Li, Z. Qian and Z. Yang, "A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS)", *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 706-713, 2011.
- [25] O. Syed, N. Walters, R. Day, H. Kim and J. Knowles, "Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5043-5054, 2014.
- [26] B. Brown, C. Barnes, R. Kasick, R. Michel, T. Gilbert, D. Beer-Stolz, D. Castner, B. Ratner and S. Badylak, "Surface characterization of extracellular matrix scaffolds", *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 428-437, 2010.
- [27] A. D'Amore, J. Stella, W. Wagner and M. Sacks, "Characterization of the complete fiber network topology of planar fibrous tissues and scaffolds", *Biomaterials*, vol. 31, no. 20, pp. 5345-5354, 2010.
- [28] D. Nordstokke, B. Zumbo, S. Cairns and D. Saklofske, "The operating characteristics of the nonparametric Levene test for equal variances with assessment and evaluation data", *Practical Assessment, Research and Evaluation*, vol. 16, no. 5, 2011.
- [29] K. Zhang, X. Guo, W. Zhao, G. Niu, X. Mo and Q. Fu, "Application of Wnt Pathway Inhibitor Delivering Scaffold for Inhibiting Fibrosis in Urethra Strictures: In Vitro and in Vivo Study", *IJMS*, vol. 16, no. 12, pp. 27659-27676, 2015.S.
- [30] Tottey, S. Johnson, P. Crapo, J. Reing, L. Zhang, H. Jiang, C. Medberry, B. Reines and S. Badylak, "The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties", *Biomaterials*, vol. 32, no. 1, pp. 128-136, 2011.
- [31] R. Ashley, C. Roth, B. Palmer, Y. Kibar, J. Routh, K. Fung, D. Frimberger, H. Lin and B. Kropp, "Regional variations in small intestinal submucosa evoke differences in inflammation with subsequent impact on tissue regeneration in the rat bladder augmentation model", *BJU International*, vol. 105, no. 10, pp. 1462-1468, 2009.
- [32] N. Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms", *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, no. 1, pp. 62-66, 1979.].
- [33] Z. Liu, B. Shi, H. Inyang and Y. Cai, "Magnification effects on the interpretation of SEM images of expansive soils", *Engineering Geology*, vol. 78, no. 1-2, pp. 89-94, 2005.
- [34] P. Ducheyne and K. Healy, *Comprehensive biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2011.

- [35] T. Gilbert, M. Sacks, J. Grashow, S. Woo, S. Badylak and M. Chancellor, "Fiber Kinematics of Small Intestinal Submucosa Under Biaxial and Uniaxial Stretch", *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 128, no. 6, p. 890, 2006.
- [36] D. Freytes, R. Tullius, J. Valentin, A. Stewart-Akers and S. Badylak, "Hydrated versus lyophilized forms of porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 87, no. 4, pp. 862-872, 2008.