

MIM-2005-2-27

CARTA DE PRESENTACIÓN

Profesor

LUIS MARIO MATEUS SANDOVAL

Director

Departamento de Ingeniería Mecánica

Universidad de los Andes

Estimado profesor Mateus,

Por medio de la presente me permito poner en consideración el proyecto de grado titulado: “**Caracterización de tejido biológico nativo y sustituto**” como requisito parcial de grado del programa de Magíster en Ingeniería Mecánica.

Agradezco su amable atención.

Atentamente,

BIBIANA ANDREA AMAYA MONTAÑEZ

CARACTERIZACIÓN DE TEJIDO BIOLÓGICO NATIVO Y SUSTITUTO

BIBIANA ANDREA AMAYA MONTAÑEZ

**Tesis para optar al título de
Magíster en Ingeniería Mecánica**

Asesor

**Juan Carlos Briceño
Ingeniero Mecánico**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA**

2005

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por ser una vez más ejemplo de tenacidad, responsabilidad y perseverancia. A mi familia por darme el tiempo y el apoyo necesario para llevara cabo un año de investigación, soportar los tejidos y sus constantes incomodidades.

Al Cirujano Pedro Felipe Roa, extraordinario profesional con amplia experiencia en la cirugía estética y reconstructiva, quien colaboró con materiales para esta investigación y aportó conocimientos valiosos que sólo su experiencia pueden generar.

Esta tesis prosperó gracias al apoyo incondicional y desinteresado de personas como Diana Marcela Gaitán, Diana Marcela Tabima, Julián Andrés Arias y Miller Santiago Hung quienes colaboraron de una u otra forma con material, ideas y valiosas críticas durante todo el proyecto.

Finalmente, a personas tan especiales como Oscar Ardila, John Segura e Isabel Jiménez quienes siempre me brindaron apoyo, me dieron ánimo cuando más lo necesitaba e incluso, colaboraron entusiastas en el tratamiento y obtención de los diferentes tejidos.

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVOS.....	2
1.1. OBJETIVO GENERAL:.....	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	2
2. MARCO TEORICO.....	3
2.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	3
2.2. TEJIDO CONECTIVO	4
2.2.1. Generalidades.....	4
2.2.2. Piel.....	4
2.2.2.1. Propiedades mecánicas de la piel.....	5
2.3. SOPORTES BIODEGRADABLES.....	7
2.3.1. Matrices Extracelulares (ECM).....	7
2.3.2. Submucosa intestinal porcina (SIS).....	10
3. METODOLOGIA DE EXPERIMENTACION.....	11
3.1. OBTENCIÓN DE TEJIDOS Y/O MUESTRAS.....	11
3.1.1. Tejido Porcino.....	11
3.1.2. Tejido Humano	12
3.2. FABRICACIÓN DE LAS PROBETAS:.....	14
3.3. DESECHO.....	16
3.4. PROCEDIMIENTO PARA ENSAYOS DE TENSIÓN.....	16
3.5. PROCEDIMIENTO PARA RELAJACIÓN DE ESFUERZOS	18
3.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS TEJIDOS.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28
6. CONCLUSIONES.....	31
7. REFERENCIAS	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPORTAMIENTO BAJO TENSIÓN UNIAxIAL DE LA PIEL. (TOMADA DE SILVER 2003).....	6
FIGURA 2. REGIONES DE OBTENCIÓN DE TEJIDO HUMANO.....	12
FIGURA 3. MUESTRAS DE PIEL (REGIÓN ABDOMINAL) ANTES Y DESPUÉS DE SER PROCESADAS.....	13
FIGURA 4. PROBETA DE SIS DESHIDRATADA OBTENIDA CON EL TROQUEL.....	14
FIGURA 5. PROBETAS DE SIS CORTADAS EN DIRECCIÓN A) LONGITUDINAL, B) TRANSVERSAL.....	14
FIGURA 6. MORDAZAS PARA TEJIDOS BIOLÓGICOS.....	15
FIGURA 7. PROBETA DE PIEL HUMANA LUEGO DE HABER FALLADO EN PRUEBA DE TENSIÓN UNIAxIAL.....	15
FIGURA 8. TIEMPO DE RELAJACIÓN DE ESFUERZOS EN TEJIDOS BIOLÓGICOS.....	18
FIGURA 9. ESQUEMA DIAGRAMA DE RELAJACIÓN DE ESFUERZOS	19
FIGURA 10. CURVA ESFUERZO – DEFORMACIÓN EN PIEL HUMANA OBTENIDA EN DIRECCIÓN TRANSVERSAL. ...	21
FIGURA 11. CURVA ESFUERZO – DEFORMACIÓN EN PIEL HUMANA OBTENIDA EN DIRECCIÓN LONGITUDINAL .	22
FIGURA 12. CURVA ESFUERZO – DEFORMACIÓN EN SIS BICAPA OBTENIDA EN DIRECCIÓN TRANSVERSAL.	23
FIGURA 13. CURVA ESFUERZO – DEFORMACIÓN EN SIS BICAPA OBTENIDA EN DIRECCIÓN LONGITUDINAL.....	24
FIGURA 14. TIEMPO DE RELAJACIÓN DE ESFUERZOS PARA SIS BICAPA.....	25
FIGURA 15. CURVA RELAJACIÓN DE ESFUERZOS EN SIS BICAPA CON CORTE EN DIRECCIÓN TRANSVERSAL.....	25
FIGURA 16. CURVA RELAJACIÓN DE ESFUERZOS EN SIS BICAPA CON CORTE EN DIRECCIÓN LONGITUDINAL.....	26
FIGURA 17. RESPUESTA VISCOSA Y ELÁSTICA PARA SIS BICAPA.....	26
FIGURA 18. CURVAS DE ESFUERZO-DEFORMACIÓN TÍPICAS EN LA PIEL HUMANA.....	28

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. RESULTADOS ENSAYO DE TENSIÓN A PROBETAS DE PIEL HUMANA EN SENTIDO TRANSVERSAL.	21
TABLA 2. RESULTADOS ENSAYO DE TENSIÓN A PROBETAS DE PIEL HUMANA EN SENTIDO LONGITUDINAL.	22
TABLA 3. RESULTADOS PRUEBAS DE TENSIÓN EN SIS 2 CAPAS CON CORTE EN DIRECCIÓN LONGITUDINAL.....	23
TABLA 4. RESULTADOS PRUEBAS DE TENSIÓN EN SIS 2 CAPAS CON CORTE EN DIRECCIÓN TRANSVERSAL.....	24
TABLA 5. RESULTADOS PRUEBAS DE RELAJACIÓN DE ESFUERZOS EN SIS 2 CAPAS CON CORTE EN DIRECCIÓN TRANSVERSAL Y LONGITUDINAL.....	27

INTRODUCCIÓN

Los avances alcanzados en ingeniería de tejidos y ciencias biomédicas han permitido a la Universidad de los Andes desarrollar a través de diferentes proyectos de investigación, protocolos para la obtención de matrices extracelulares, multicapas de submucosa y siembra de diferentes células en los soportes. Sin embargo, no existe un estudio completo que permita comparar los tejidos obtenidos *in vitro* con el tejido nativo que se pretende reemplazar como lo es la piel y que se hace necesario para poder avanzar en la obtención de los tejidos sustitutos viables a ser utilizados en pacientes.

A pesar de que la epidermis tiene una alta capacidad regenerativa comparada con la dermis, si las secciones que se deben reemplazar son extensas o profundas, esta capacidad se ve truncada y la regeneración de tejidos se hace deficiente debido a la formación de cicatrices que afectan la elasticidad, flexibilidad y resistencia normal de la piel.

La ingeniería de tejidos gracias a un trabajo interdisciplinario que combina principios de la ingeniería y de las ciencias vivas, busca desarrollar tejidos sustitutos que permitan la curación de estas complejas heridas con buenos resultados físicos, mecánicos y estéticos [Lanza, 2000].

Las matrices extracelulares son una fuente rica de diversos tipos de colágeno; sus concentraciones y la orientación de las fibras que las componen generan el ambiente adecuado para el crecimiento celular *in vivo* e *in vitro* [Badyak, 2002]. Mediante experimentación preliminar en modelos animales se ha logrado determinar que la *Submucosa Intestinal Porcina* (SIS por sus iniciales en inglés: Porcine small intestinal submucosa) sirve como un soporte biodegradable para la regeneración o remodelación de estructuras especializadas como tracto urinario, ligamentos, arterias, venas y para el tratamiento de úlceras y quemaduras. Se ha utilizado en humanos en más de 4000 pacientes mostrando respuestas favorables al proceso curativo [Lindberg, 2001].

En este proyecto de investigación, enmarcado dentro de la ingeniería de tejidos se pretende avanzar en la obtención de tejidos sustitutos *in vitro*, específicamente sustitutos dérmicos, mediante la manipulación de matrices extracelulares, el cultivo primario de fibroblastos aislados de piel de ratón neonato y su siembra en multicapas de submucosa intestinal porcina.

El aporte fundamental de la investigación radica no sólo en el afianzamiento de los protocolos establecidos para obtener tejidos sustitutos, sino en la caracterización mecánica, histológica y físico-química que se hace de estos tejidos y de piel humana, para poder en trabajos posteriores, modelar o predecir el comportamiento de los injertos de forma más segura y confiable.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General:

En este proyecto de investigación se llevó a cabo una caracterización de tejido nativo (piel humana) y sustituto obtenido de Submucosa Intestinal Porcina acelular, buscando ampliar el conocimiento que se tiene sobre el comportamiento de éstos y así avanzar en el desarrollo de tejidos sustitutos in Vitro.

1.2. Objetivos Específicos:

Caracterizar mecánicamente tejido nativo (piel humana) y sustituto mediante la aplicación de protocolos establecidos con anterioridad y adaptados a las condiciones de los laboratorios de la Universidad de los Andes.

Analizar los resultados obtenidos de los tejidos en estudio para avanzar en el entendimiento de la generación de tejido in Vitro.

Aportar información y herramientas útiles para seguir avanzando en el área de tejidos en el grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de los Andes.

2. MARCO TEORICO

2.1. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una línea de trabajo interdisciplinario que combina principios de la ingeniería y de las ciencias vivas para desarrollar sustitutos que mejoren las condiciones de funcionamiento de diferentes órganos o tejidos.

Dentro de las líneas de investigación se debe trabajar la obtención, diferenciación y crecimiento de líneas celulares especializadas, la creación de soportes biodegradables que se asemejen y comporten lo más parecido posible al tejido nativo y la optimización del proceso de obtención de los sustitutos para evitar la contaminación bacteriana y micótica de los tejidos cultivados [Garat, 2004].

Las principales limitaciones que se presentan al realizar transplantes de tejidos radican en la dificultad de conseguir los tamaños necesarios de tejidos, la presencia de úlceras o heridas de tipo crónico que requieren tratamientos recurrentes, complicaciones médicas como una curación lenta, mala cicatrización, dolor e infecciones, entre otras. Durante años se ha buscado incesantemente nuevas fuentes de tejido ya sea de tipo alogénico (proveniente de otros individuos) ó xenogénicos (provenientes de otras especies) que si bien brindan nuevas posibilidades de tratamientos, no están exentos aún de limitaciones de tipo ético, inmunológico y económico. Debido a esto, es que la exploración de materiales sintéticos ó biosintéticos se ha convertido en una interesante área de estudio e investigación.

Dentro de los principales objetivos que se tienen en la ingeniería de tejidos se encuentra la búsqueda de tejidos sustitutos que presenten buenas condiciones mecánicas, que permitan regular el transporte de los fluidos a través de ellos, que sean resistentes a los microbios, que tengan pocas probabilidades de infección y que permitan obtener resultados estéticamente aceptables [Lanza, 2000].

Al estudiar los tejidos es necesario diferenciar cuatro tipos básicos: El epitelial, el nervioso, el muscular y el conectivo, siendo este último de particular interés en este trabajo.

2.2. Tejido Conectivo

2.2.1. Generalidades

Los tejidos conectivos se reconocen básicamente por el tipo de células, la sustancia fundamental que los conforman, las fibras y su organización. Basados en esto se clasifican en:

Tejido conectivo Suelto: Es un tejido con abundante sustancia fundamental y fibras delgadas y “esparcidas”. Tiene una consistencia de gel y es importante para la difusión de oxígeno y nutrientes hacia y desde los pequeños vasos sanguíneos. Se encuentra fundamentalmente debajo del epitelio limitando las partes internas del organismo.

Tejido conectivo Denso e Irregular: En este tejido las fibras de colágeno conforman el seno del tejido. Las únicas células que se encuentran son escasos fibroblastos presentes. La abundancia de fibras de colágeno da al tejido la resistencia; éstas se acomodan en “manojos” en diferentes direcciones de ahí su definición como irregular y su capacidad de soportar esfuerzos en varias direcciones. Se encuentra en el exterior de diversos órganos, en la dermis de la piel y en una capa independiente que se trata en muchos casos como mucosa.

Tejido conectivo Denso y Regular: En este tipo de tejido las fibras de colágeno se acomodan regularmente permitiendo que algunas células se ubiquen entre los husos adyacentes y paralelos. Se encuentran principalmente en tendones, ligamentos y aponeurosis.

El tejido conectivo está formado por células y por un material extracelular segregado por algunas de estas células (especialmente fibroblastos) que forma una matriz. Las diferentes cantidades encontradas de las macromoléculas presentes y la forma en que estas se organizan dan origen a diversos tipos de matriz como matriz dura extracelular del hueso ó la matriz extracelular blanda de la piel.

2.2.2. Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y dentro de sus funciones está servir como barrera protectora contra el medio ambiente, termorregular el cuerpo, proteger los órganos internos contra lesiones mecánicas, homeostasis, detección de sensaciones, autocuración, entre otras [Lanza, 2000].

La piel un tejido heterogéneo compuesto por 3 capas principales superpuestas y conectadas entre sí, con características, composición y propiedades diferentes conocidas como epidermis, dermis papilar y dermis reticular:

La Epidermis: Su espesor depende de la zona del cuerpo y se compone primordialmente de queratinocitos que forman un epitelio escamoso estratificado por células proliferantes en la capa basal de la epidermis que la une con la siguiente capa (dermis). Está formada por láminas de keratina, contiene células con pigmentos conocidas como melanocitos, células defensivas (Langerhans), células nerviosas con funciones hormonales (Merkel) y no posee vasos sanguíneos. Su espesor depende de la zona del cuerpo pero oscila entre 0.07 y 0.12mm.

La Dermis: Es básicamente tejido conjuntivo sobre la cual reposa la epidermis; se divide en dos regiones:

Dermis papilar que reposa justo debajo de la epidermis. Aporta el 10% del grosor a la dermis y en ella las fibrillas de colágeno oscilan entre 20 y 40nm y se agrupan en fibras más gruesas de 0.3 a 3 μ m de diámetro [Silver.2001].

Dermis reticular que es una capa mas profunda y por debajo de la papilar. Ésta última contiene fibras gruesas de colágeno entre 60 y 100 nm de diámetro formadas por fibrillas de 10 y 40 μ m. Es prácticamente acelular y formada por intrincada red de fibras de colágeno y elastina.

Esta capa es la que le brinda a la piel la mayor parte de su resistencia, flexibilidad y elasticidad y que forma el soporte para el extenso sistema sanguíneo, linfático y nervioso [Lanza, 2000]. Los fibroblastos son las células predominantes de este tejido y son los encargados de mantener la matriz extracelular. Su espesor oscila entre 1 y 4 mm.

La Hipodermis: Esta formado por tejido conjuntivo de tipo laxo, une la dermis con los órganos subyacentes y tiene una capa de tejido adiposo que permite que la piel se proteja contra la pérdida de calor y traumatismos leves.

2.2.2.1. Propiedades mecánicas de la piel

La respuesta de la piel a cargas mecánicas depende de factores como la zona del cuerpo de donde se extrae la muestra generando diferentes comportamientos incluso para el mismo individuo; depende también de la dirección en la que se

corta la muestra (relacionado con las líneas Langer), la edad, la salud general del individuo y el peso corporal.

Cuando se realiza una prueba de tensión uniaxial sobre una muestra de piel, progresivamente va cambiando su espesor y el volumen total de la muestra debido al proceso de extracción de líquidos que se da a medida que la carga se aplica.

A través de estudios biomecánicos se ha comprobado que la piel es un tejido viscoelástico y su comportamiento se debe a la respuesta mecánica que presenta frente a cargas; existe un componente viscoso asociado a disipación de energía y un componente elástico relacionado con almacenamiento de ésta. Las propiedades mecánicas de la piel se relacionan fuertemente con la estructura del colágeno, las fibras de elastina y los proteoglicanos presentes en ella.

Cuando sobre la piel se aplica una energía, la disipación inicial se debe al deslizamiento de las fibras de colágeno entre sí mientras se van direccionando en el mismo sentido de aplicación de la fuerza, luego los componentes elásticos son los responsables de la recuperación de la forma.

En las graficas de esfuerzo-deformación de la piel, el comportamiento puede dividirse en tres regiones claras:

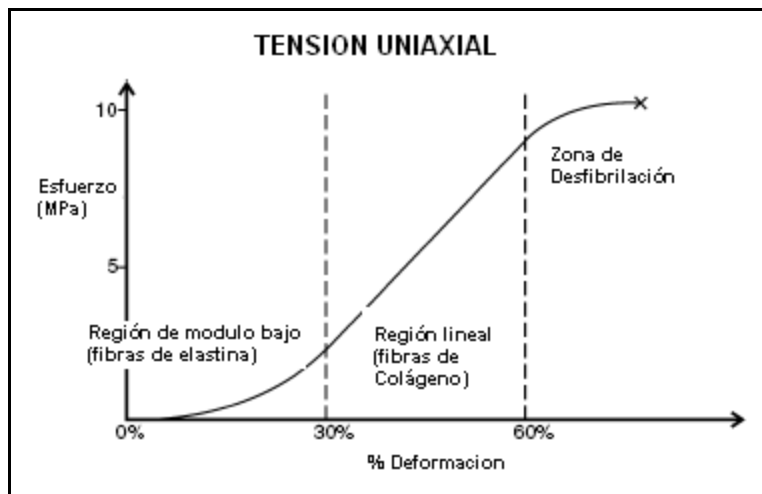


Figura 1. Comportamiento bajo tensión uniaxial de la piel. (tomada de silver 2003)

Para deformaciones de hasta 30% la red entrecruzada de colágeno ofrece muy poca resistencia a ser deformada y la respuesta está dada por las fibras de elastina. Estas fibras se consideran responsables de generar la recuperación de la forma original de la piel una vez la carga se ha liberado. Las fibras de colágeno

aunque no participan en gran medida y sólo se empiezan a direccionar, son las responsables de prevenir una fractura mecánica abrupta en la piel [Silver.2003].

Entre el 30 y 60% de la deformación, las fibras de colágeno empiezan a reaccionar. En esta región se puede distinguir una zona lineal en la cual el componente elástico domina la deformación. En esta etapa se da un estiramiento de muchas moléculas presentes en la matriz extracelular y de zonas flexibles de las fibras de colágeno entrecruzadas.

Luego del 60% de deformación el material falla debido a un fenómeno de desfibrilación que se genera cuando las fibras se estiran más allá de sus capacidades y se genera un deslizamiento entre fibras con ruptura entre ellas.

El comportamiento elástico de la piel se relaciona con un almacenamiento de energía que se da por el estiramiento de las fibras, mientras que la zona de comportamiento viscoso determina la energía que el tejido es capaz de liberar cuando las fibras se empiezan a deslizar unas sobre otras. Se debe tener en cuenta para la experimentación que la tasa de carga sobre el material no afectará la pendiente de la curva esfuerzo-deformación, si se asume las fibras que componen el tejido como resortes ideales.

Las fibras de elastina presentes en la piel ayudan a generar una red entrecruzada de fibras de colágeno que les hace dar la forma de malla tridimensional. Estas fibras de elastina favorecen el proceso de recuperación hacia la forma original de las fibras de colágeno cuando las fuerzas aplicadas no son muy grandes; las proteínas, macromoléculas y el agua que está contenida dentro de la matriz extracelular actúan en un proceso de deformación como lubricantes y bajo cargas extremas, éstas se pierden completamente como fluidos extraídos. Si se suspende el proceso de carga, para que el tejido se recupere completamente es necesario que los fluidos perdidos se restablezcan; in vivo esto se logra gracias a los tejidos vecinos pero in vitro es prácticamente imposible restablecerlos por lo que pruebas mecánicas como tensión uniaxial son consideradas de tipo destructivo.

2.3. Soportes biodegradables

2.3.1. Matrices Extracelulares (ECM)

Las matrices extracelulares (ECM por sus iniciales en inglés, extracellular matrix) son consideradas como soportes biológicos degradables que brindan las condiciones necesarias para una adecuada remodelación de tejidos, debido a sus

componentes estructurales y funcionales. Algunas fuentes de ECM son la dermis de la piel, la submucosa del intestino delgado, la vejiga urinaria, el pericardio, la membrana base y el estroma de hígado y el tendón de Aquiles, estos últimos decelularizados. [Badylak, 2002]

La matriz extracelular es una estructura tridimensional compleja donde se mezclan de forma particular proteínas estructurales y funcionales, glicoproteínas y proteoglicanos que proveen el soporte estructural de la matriz, le dan resistencia mecánica, generan sitios activos para enlazar otras moléculas y son una fuente de factores moleculares que se encargan de regular las funciones del tejido anfitrión, como la angiogénesis, la migración, proliferación y diferenciación celular y la respuesta inflamatoria e inmunológica ante una herida [Badylak, 2002].

La matriz extracelular se compone de una sustancia fundamental y de fibras. La primera es una sustancia que ocupa el espacio entre las células y las fibras, tiene un alto contenido de agua y por lo general tiene una apariencia amorfa; contiene una gran cantidad de proteoglicanos y ácido hialurónico. Las segundas se clasifican en fibras de colágeno, reticulares y elásticas y la cantidad que se encuentre de cada una de ellas dependerá del tipo de tejido conectivo.

Las fibras de colágeno son las más comunes, son flexibles y tienen una alta resistencia a tensión; tiene forma de líneas ondulantes, son de longitud y diámetro variable. Están formadas por subunidades similares a hilos o husos que se denominan fibrillas de colágeno. Cada una de estas fibrillas está formada por moléculas de colágeno que se unen entre sí por los extremos formando filas unas sobre otras. La resistencia de las fibrillas se debe a los enlaces colaventes entre las filas adyacentes.

La molécula de colágeno está formada por tres cadenas diferentes de polipéptidos entrelazadas que forman una hélice. Se han identificado 16 tipos de colágeno que se denotan con números romanos dependiendo de la cronología de su descubrimiento. El tipo I es el que más frecuentemente se encuentra y compone alrededor de un 90% del colágeno del cuerpo al estar presente en la dermis de piel, huesos, tendones, etc.

Las fibras reticulares están formadas por fibrillas de colágeno tipo III y en ocasiones de tipo IV. Las fibrillas individuales que forman las fibras son mucho más delgadas que las fibras de colágeno y no se agrupan para formar fibras gruesas. Su nombre se debe a su conformación similar a una malla y genera un soporte para constituyentes celulares de distintos tejidos y órganos. Las fibras reticulares son producidas por los fibroblastos en la mayoría de los casos aunque hay áreas

donde existen células especializadas llamadas células reticulares como en nervios periféricos (células de Schwann), en la túnica media de los vasos sanguíneos, etc.

Las fibras elásticas son más delgadas que las fibras de colágeno y están acomodadas en un patrón ramificado que genera una red tridimensional; estas fibras permiten a los tejidos estirarse y distorsionarse frente a aplicación de cargas y se entretrejen con fibras de colágeno para limitar la distensión y evitar la ruptura.

Estas fibras están hechas de elastina y de microfibrillas. La elastina es una proteína similar al colágeno con un polipéptido especial en su estructura que lo hace envolverse de una manera particular. Dos aminoácidos únicos en la elastina, la desmosina y la isodesmosina hacen que las moléculas de elastina se unan covalentemente entre sí generando una matriz de elastina que participa por completo en los procesos de estiramiento y recuperación elástica de los tejidos. Las microfibrillas están hechas de glicoproteínas fibrilares y cuando se está generando un tejido aparecen antes que la elastina pues son responsables de organizar la estructura apropiada para la generación.

La Fibronectina es otra proteína de interés particular en la reparación de tejidos usando matrices extracelulares debido a su capacidad de adherir muchas células de diversos tipos gracias a sus ligandos. Se ha encontrado que la fibronectina proveniente de SIS es parcialmente responsable de la unión de células endoteliales, fibroblastos, monocitos y la biocompatibilidad del sustituto con el anfitrión durante la reconstrucción *in vivo* [Badylak, 2002].

Los glicosaminoglucanos (GAG) son moléculas que pueden unirse de forma covalente a otras proteínas (factores de crecimiento y citoquinas), formando macromoléculas más complejas llamadas proteoglicanos. Los GAGs son cadenas largas de polisacáridos formadas por unidades repetitivas de disacáridos. Algunos de estos azúcares tienen grupos sulfato y carboxil que generan una carga negativa en la molécula, responsable de la alta atracción por moléculas de agua y la formación de un gel hidratado. Este compuesto permite la rápida difusión de agua, metabolitos, hormonas y nutrientes entre la sangre y las células tisulares, pero impiden el movimiento de moléculas más grandes o de bacterias.

Dentro de las células que se encuentran en el tejido conectivo existen algunas que son fijas (residentes permanentes en el tejido) y otras que son transitorias (entran en el tejido solo para cumplir alguna función específica).

Los fibroblastos son las células principales del tejido conectivo, se les considera responsables de la secreción secuencial o simultánea de los principales tipos de

fibras y de los carbohidratos de la sustancia base de la matriz extracelular. Estas células poseen un retículo endoplasmático desarrollado, un aparato de Golgi, escasas vesículas de secreción y orgánulos que se relacionan con la síntesis de moléculas precursoras del colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas. Tienen un citoesqueleto desarrollado con microtúbulos y microfilamentos de actina que favorecen su motilidad celular, factor fundamental en el proceso de cicatrización de heridas y regeneración de tejidos ya que los fibroblastos tiene la capacidad de migrar hacia la zona lesionada, proliferar y producir los componentes de la matriz extracelular. Mediante procedimientos histológicos es posible identificar su núcleo como una estructura alargada y discal.

2.3.2. Submucosa intestinal porcina (SIS)

Un biomaterial nuevo obtenido de la submucosa intestino de porcinos fue descubierto en 1987 en la Universidad de Purdue, Indiana, cuando investigadores buscaban materiales biológicos útiles en la reconstrucción de conductos sanguíneos.[Brown-Etris]

La SIS es un soporte de colágeno de tipo biodegradable, bioabsorbible y acelular que se obtiene del intestino delgado de los porcinos [Lindberg, 2001] y que mediante un adecuado procedimiento de separación de capas, descelularización y esterilización permite obtener una matriz extracelular ampliamente utilizada en la reparación de tejidos lastimados (úlceras), reconstrucción del tracto urinario y de sistema vascular, entre otras [Badyłak, 2002].

Está formado por colágeno Tipo I y III en un 90% y en menor proporción de colágeno Tipo V y VI. En la matriz se puede encontrar una mezcla de fibronectina, condroitin sulfato A y B, heparina, heparan-sulfato y ácido hialurónico. Además se encuentran citoquinas y una serie de factores de crecimiento como el factor beta de transformación (TGF- β) y factor de crecimiento de fibroblastos [Badyłak, 2002; Lindberg, 2001].

Cuando se utiliza en procesos de remodelación de tejidos, se ha encontrado que usando este soporte en particular, la respuesta angiogénica es rápida, se da una buena adhesión de células dermales y fibroblastos y se evidencia un favorable proceso de absorción del soporte por el anfitrión.

3. METODOLOGIA DE EXPERIMENTACION

La metodología de experimentación incluye una primera fase que radica en la obtención de los tejidos a analizar y una fase posterior que implica la caracterización que de ellos se hace. En este documento se enuncian los protocolos utilizados para obtener tejidos biológicos, en especial piel humana y submucosa intestinal porcina.

3.1. *Obtención de tejidos y/o muestras*

3.1.1. Tejido Porcino

Para obtener el tejido porcino estudiado, es decir submucosa intestinal se debe tener en cuenta lo siguiente:

- ☞ Para ingresar al sitio donde se obtienen las muestras (Frigoríficos) se debe tener overol, botas, guantes, tapabocas y cofia.
- ☞ Se debe tener tijeras afiladas y previamente flameadas (preferiblemente de acero inoxidable). Se puede usar en algunos casos cuchillo pero con las mismas recomendaciones.
- ☞ Tener bolsas plásticas (preferiblemente ziploc) para guardar las muestras biológicas, totalmente sumergidas en suero enfriado con anticipación a 4°C.
- ☞ Tener una nevera o recipiente con hielo para sumergir las muestras desde que se hace la extracción hasta que se preparan las probetas.
- ☞ Para la extracción de SIS es necesario tener en cuenta que se está tomando intestino delgado y no otro tejido. Para ello es necesario contar con la ayuda del veterinario encargado quien inspecciona el intestino buscando la porción adecuada (el intestino delgado se caracteriza por su color rosado-violáceo y por su textura grumosa (los grumos son tejido que se retira en la preparación).
- ☞ Una vez se han extraído los tejidos de interés se sumergen dentro de bolsas con solución salina previamente enfriada a 4°C y se guardan en la nevera con hielo.

La SIS también se puede obtener directamente en el mercado y se encuentra disponible en su forma deshidratada, por lo cual, un tratamiento de hidratación con suero es necesario antes de realizar las pruebas. Sin embargo si se llegará a necesitar producir en el laboratorio este tejido, los protocolos ampliamente establecidos y comprobados en trabajos e investigaciones anteriores [Tabima, 2003; Borrás, 2005].

3.1.2. Tejido Humano

Las normas a seguir y los procedimientos son similares a los que se realizan para tejido porcino. Se debe tener especial cuidado con los objetos cortopunzantes para evitar cortaduras o pinchazos mientras se manipulan los tejidos humanos. La manipulación requiere los mismos instrumentos y temperaturas.

Las muestras de piel humana se obtienen a partir de excedentes de cirugía plástica en procedimientos como reducción de busto, de abdomen y de brazos. Las muestras entregadas se almacenan inmediatamente en solución salina a 4°C y se llevan a proceso de limpieza y preparación.

A las muestras de piel se les debe retirar la grasa subcutánea y se deben conservar en solución salina a 4°C hasta que se realicen los análisis biomecánicos. Antes de realizar las pruebas se debe lavar con abundante agua.

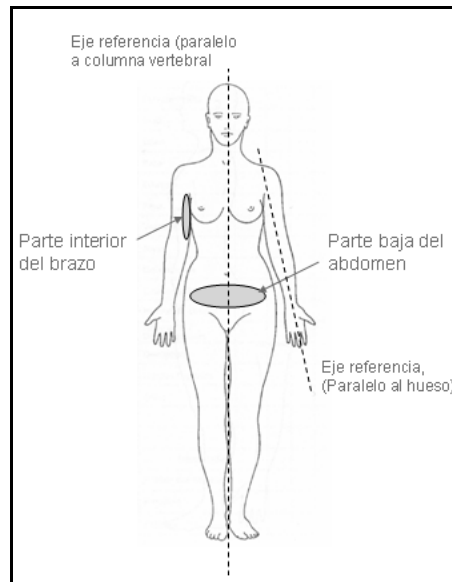


Figura 2. Regiones de obtención de tejido humano¹

¹ Imagen recuperada de la pagina <http://www.derechos.org/nizkor/peru/libros/fosas/anexo3.html> y modificada para ilustrar las zonas del cuerpo humano utilizadas en este trabajo.

Para realizar la limpieza de la piel, es necesario contar con tijeras para cortar preliminarmente la gruesa capa de grasa subcutánea, teniendo en cuenta no lastimar (cortar, rasguñar ó rasgar) la piel directamente. Las recomendaciones para hacer este procedimiento consisten en tomar en una mano el tejido a limpiar y con la otra mano cortar muy despacio la grasa y retirarla poco a poco.

Las pruebas se realizaron habiendo limpiado al máximo el tejido, esto no significa que al final de la limpieza, no existas trazas minúsculas de grasa en la parte posterior de la piel. Es necesario aclarar que hay grumos o cúmulos de grasa que no se pueden retirar sin lastimar el tejido, por lo que es preferible dejarlos y tener esto en cuenta en el momento de analizar los resultados, si llegase a existir una variación del comportamiento esperado (lo anterior no ocurrió en ninguna de las pruebas realizadas). En la Figura 3 se puede observar a la izquierda, parte A, una porción típica de tejido de muestra proveniente de la zona abdominal de una paciente sometida a abdominoplastia; se muestra la parte posterior, es decir la capa adiposa subcutánea que debe ser delicadamente retirada. La foto de la derecha B) muestra la piel una vez limpiada (vista anterior) y la foto C es la vista posterior de la piel limpia. Se pueden observar las trazas que aún prevalecen de grasa.

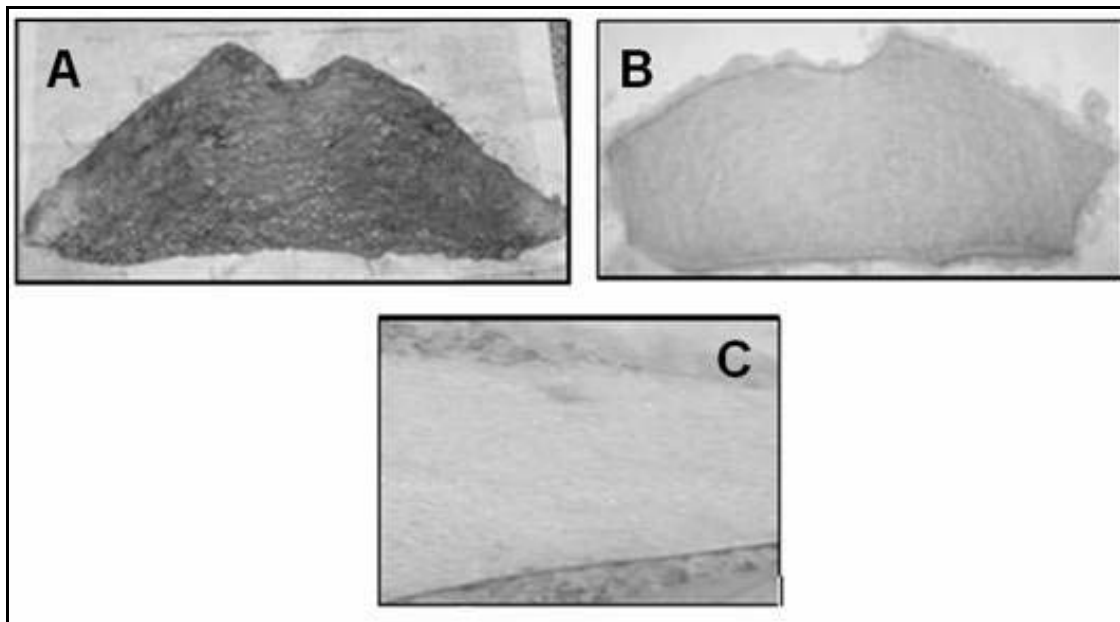


Figura 3. Muestras de piel (región abdominal) antes y después de ser procesadas.

Si se llegase a utilizar piel de cadáver, es recomendable que las muestras correspondan a cuerpos con máximo 24 horas post-mortem. [Edsberg]. Si se tiene

una disponibilidad completa de piel de cadáver, las muestras se harían siguiendo las especificaciones de la norma ASTM-638, Tipo V y se analizarían muestras de piel provenientes de diferentes zonas del cuerpo para analizar la variabilidad de las propiedades según el grosor de la piel [Reihnsner, 1995]

3.2. Fabricación de las probetas:

Las probetas para los ensayos de tensión y relajación de esfuerzos se obtienen siguiendo el mismo protocolo:

Las probetas utilizadas para las pruebas de caracterización mecánica se obtienen utilizando un troquel diseñado para tal fin. Este troquel se debe lavar cuidadosamente con hipoclorito de sodio cada vez que se utiliza y los bordes se deben afilar con regularidad. Para hacer las probetas, se golpea el troquel con un martillo y sobre una superficie blanda como madera o papel periódico (para evitar daños en el troquel).

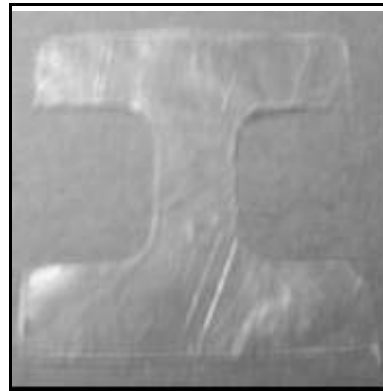


Figura 4. Probeta de SIS deshidratada obtenida con el troquel.

Es muy importante que la persona que va a troquelar los tejidos no “estire” demasiado los tejidos. Las probetas se deben obtener de tejidos relajados, es decir, al colocar el tejido sobre la superficie para hacer el corte no se debe tensionar el tejido, por el contrario lo único que se debe hacer es quitar arrugas o dobleces y permitir al tejido acoplarse solo.

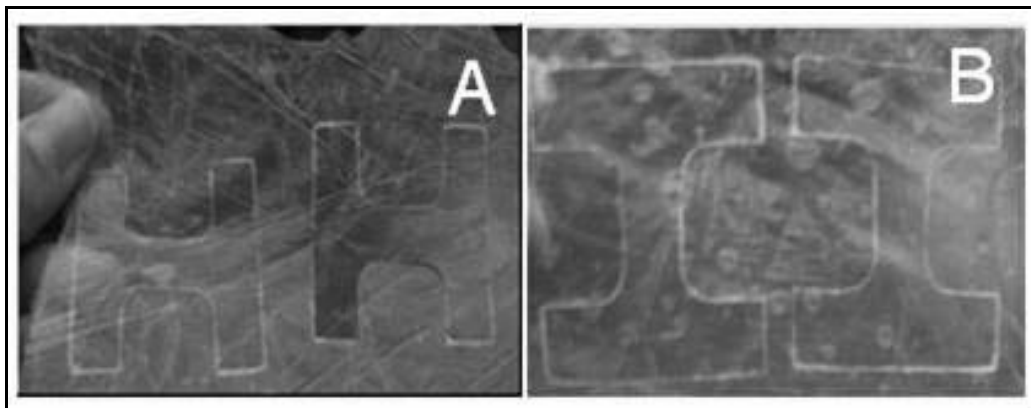


Figura 5. Probetas de SIS cortadas en dirección a) longitudinal, b) transversal.

Para asegurar el corte longitudinal o transversal en los ductos se recomienda colocar los tejidos sobre una hoja con marcaciones (hoja rayada o cuadrículada) de tal manera, que los bordes del troquel y el tejido abierto se pueden alinear con dichas marcas.

Durante las pruebas se debe asegurar que los tejidos están sumergidos en solución salina antes de cada prueba y sólo retirarlas de este medio cuando la probeta se va a probar.

Quienes vayan a participar en la experimentación deben tener bata, guantes, tapabocas y cofia.

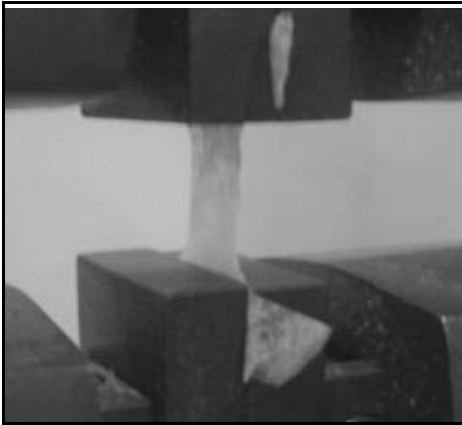


Figura 6. Mordazas para tejidos biológicos.

Las probetas se deben manipular con guantes y con pinzas para tejidos, que hayan sido flameadas con anticipación. Es recomendable que las mordazas del equipo se cubran con vinipel y se les coloque papel absorbente alrededor de ellas para que no se filtre líquido dentro de la máquina durante la prueba. Esto especialmente en tejido humano.

Cada probeta luego de fallar se almacena en una bolsa roja, para desechos biológicos, junto con el papel y vinipel utilizado en la prueba. Es recomendable tomar foto a la probeta que falló para posteriores análisis.

Todos los materiales utilizados durante la prueba se limpian cuidadosamente con hipoclorito de sodio y se secan con papel absorbente.



Figura 7. Probeta de Piel humana luego de haber fallado en prueba de tensión uniaxial.

3.3. Desecho

Los desechos en este proceso se pueden dar en i) limpieza de los tejidos, ii) preparación de las probetas y iii) prueba o falla de las probetas.

Una vez finaliza cada uno de estos procesos, todos los desechos orgánicos (tejido, arteria, grasa, etc) se almacenan en una bolsa roja para desechos biológicos y se cierra cuidadosamente. Se debe etiquetar la bolsa indicando el origen del material biológico que contiene, así como su fecha de obtención. Esta bolsa se puede desechar en los lugares para ello indicado en facultades como la de Medicina (laboratorio de anatomía humana), en el laboratorio de Genética Humana o en la Fundación Cardioinfantil si allí se pueden preparar los tejidos.

Los elementos usados como guantes y tapabocas, se eliminan luego de un único uso y los instrumentos se deben lavar cuidadosamente y flamear con alcohol para esterilizarlos.

3.4. Procedimiento para ensayos de Tensión

En los ensayos de tensión, la velocidad de carga es la variable principal a fijar. Dicha velocidad se debe investigar con anticipación para poder realizar la práctica. Para realizar el montaje de la probeta, se deben seguir los pasos ya mencionados sobre preparación de mordazas.

De la prueba de tensión se obtiene un archivo con los datos de carga y deformación de la probeta en el tiempo. Para poder realizar la grafica Esfuerzo-Deformación se deben tener los siguientes datos de cada una de las probetas:

✂ **Longitud entre mordazas:** Esta dimensión se fija teniendo en cuenta la longitud del cuello de las probetas. Como éstas se hacen con un mismo troquel se puede fijar este valor para todas (una vez más es importante que las probetas se hagan sin haber estirado demasiado los tejidos; lo anterior genera probetas mas pequeñas pues el tejido se “encoge” y las dimensiones ingresadas en la prueba no corresponderán a todas las probetas por igual.

✂ **Ancho de la probeta:** Esta dimensión es el ancho del cuello de las probetas (los troqueles usados generan probetas con ancho de cuello de 10mm). Se fija para todas por igual.

- ✎ **Espesor de la probeta:** Este valor se debe registrar de forma independiente para cada una de las probetas. Haciendo uso de un micrómetro, se determina el espesor de la probeta preferiblemente en 3 o 4 puntos del cuello; se halla un promedio de estos valores y éste último se ingresa como el espesor de la probeta a tensionar.

Con el ancho y el espesor de las probetas es posible encontrar el área transversal que soporta la carga en cada instante de la prueba, de tal manera que los datos de Carga (N) se convierten en Esfuerzo (Pa) ($\sigma = F/A$); la deformación se puede encontrar utilizando la extensión dada por el quipo como Extensión (mm) y usando la longitud inicial $\varepsilon = \text{Extensión}/L_0$. Esta última se puede expresar como mm/mm ó como porcentaje de deformación.

La grafica Esfuerzo-Deformación se construye a partir de los datos procesados y de ella se obtiene la siguiente información:

- ✎ **Módulo E:** Este módulo relacionado con la elasticidad de los tejidos se obtiene de la pendiente la parte lineal de la grafica. En la práctica dicha parte se encuentra desde el 10% hasta el 50% de deformación dependiendo del tejido. Para encontrar la zona lineal se puede hacer una regresión lineal de los puntos que más tendencia lineal tienen. Un valor de R de 0.97 es adecuado para aceptar linealidad.
- ✎ **Esfuerzo Máximo:** Se considera como el punto más alto alcanzado en el eje de esfuerzo por el tejido. Para interpretar este valor es necesario tener en cuenta que algunos tejidos se pueden de-laminar, de tal manera que la parte inicial de la curva esfuerzo-deformación se ve escalonada pero siempre con tendencia ascendente. Para reportar este resultado se debe tener en cuenta cómo se comportó la probeta, si de-laminó o se fracturó. Se puede mencionar cada uno de los picos de esfuerzo donde cedían cada una de las capas si ese fuera el caso.
- ✎ **Deformación máxima:** Corresponde al valor de deformación en el que se alcanzó cada uno de los valores de esfuerzo máximo reportado en el punto anterior.

Cuando se están estudiando tejidos en forma de conductos y en los cuales se pretende esclarecer o comprobar un comportamiento característico según la dirección de corte, es necesario analizar las graficas esfuerzo-deformación de cada grupo de corte. Para poder afirmar la existencia o no de tendencias, se puede hacer un análisis estadístico de los datos de ambos grupos y mirar si hay

diferencias significativas en los módulos de elasticidad, esfuerzo máximo y deformación. Para ello obviamente se necesita tener un grupo de datos significativo, en número ($n > 15$) y calidad (tejidos libres de patologías o defectos físicos que alteren los resultados), el promedio y la desviación de cada grupo.

3.5. Procedimiento para relajación de esfuerzos

Para la práctica de relajación de esfuerzos se preparan las probetas de la misma manera que las de tensión. Parámetros claves en este ensayo son la tasa de carga y el tiempo que se deja relajar el tejido en cada etapa.

Para encontrar el tiempo adecuado se debe hacer un ensayo preliminar que consiste en cargar una probeta hasta cierta deformación (5% de la longitud inicial del cuello), liberar la carga y registrar el cambio en los esfuerzos que se presentan en el tiempo. Al dejar de aplicar una carga pero manteniendo la deformación, la distribución de esfuerzos dentro del tejido empieza a cambiar y se da un proceso de relajación en la microestructura tisular. El tiempo que se debe utilizar en la prueba de relajación será aquel en que estos esfuerzos ya no cambien y dependerá de cada tejido. Una grafica con el comportamiento de la Figura 8 se encontrará para diversos tejidos luego de ensayos preliminares.

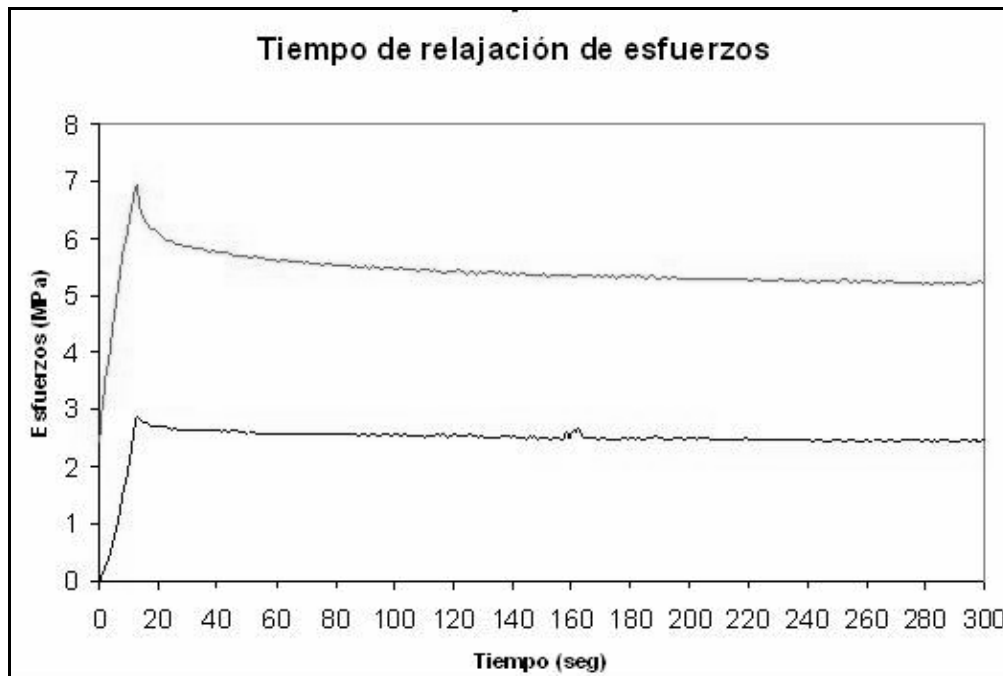


Figura 8. Tiempo de relajación de esfuerzos en tejidos biológicos.

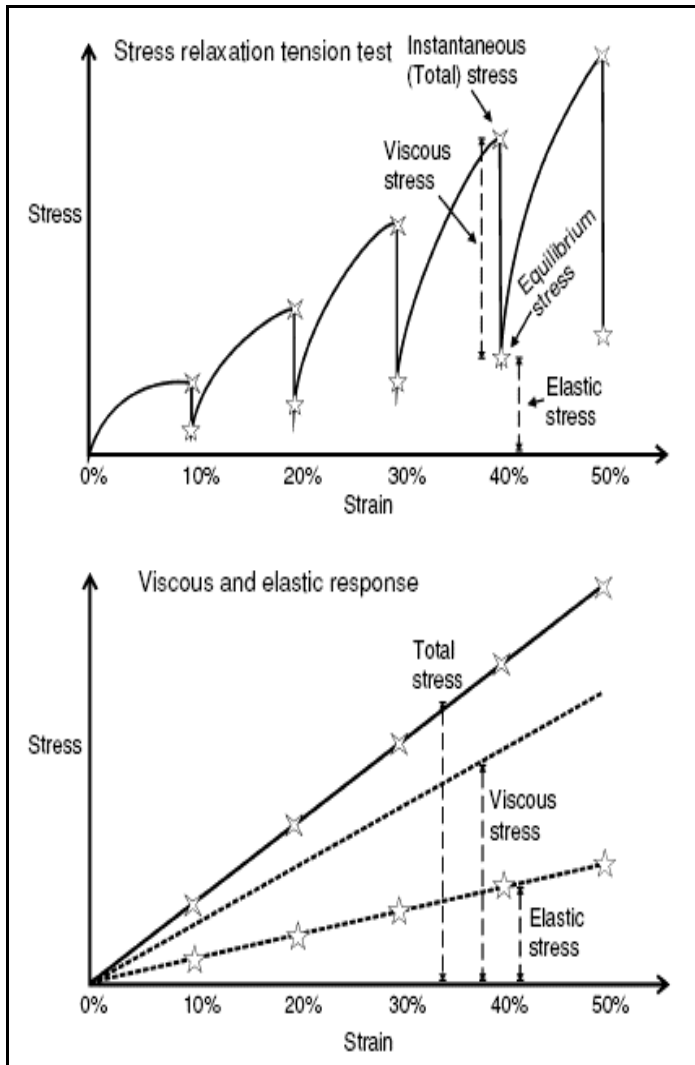


Figura 9. Esquema Diagrama de Relajación de Esfuerzos 2

Una vez se tiene el tiempo y la carga, se intentará construir una gráfica como la de la Figura 9.

En esta curva se grafican cada una de las etapas de tensión y relajación hechas sobre la probeta, es decir, dicha gráfica nace de hacer pruebas de tensión a una misma probeta de forma consecutiva, siguiendo los siguientes pasos:

a. Montar la probeta como si fuera un ensayo de tensión.

b. Programar la máquina para detener la deformación en 5%. Esto depende de la longitud de cuello de la probeta.

c. Realizar la primera carga hasta lograr deformar en 5% la probeta de tejido. Cuando se alcanza esa deformación se suspende la carga SIEMPRE registrando los datos en el software de la Instron.

d. Desde el momento en que se detiene la aplicación de carga, empieza a correr el tiempo de relajación que se había obtenido en los ensayos preliminares.

² Imágenes tomadas de Silver (2003) "Mechanobiology of transduction in dermal tissue".

e. Una vez transcurrido este tiempo se vuelve a cargar la probeta, con la misma velocidad y hasta obtener otro 5% adicional. Esta será la segunda etapa de la curva y se repite el paso d. Es importante durante la práctica hacer la deformación hasta 5% pues permite hallar un buen número de puntos sin que falle la probeta.

La Instron genera un archivo con los datos similares a los de tensión y eslabo del practicante, unir las etapas con la deformación y esfuerzo acumulado; sólo así se obtendrá una gráfica como la deseada. De esta gráfica se leerán los valores de esfuerzo máximos y mínimos en cada una de las etapas (dichos puntos se muestran con estrellas en la Figura 9) y constituirán las rectas de i) *Respuesta Elástica* (desde el eje hasta el mínimo de cada etapa) y ii) *Respuesta Viscosa* (diferencia entre el esfuerzo máximo y mínimo en cada etapa).

Una vez se hallan cada uno de los puntos, se hace una regresión lineal con los máximos y mínimos y se construyen rectas como se ve en la parte inferior de la Figura 9. La pendiente de cada una de estas rectas se reportará como Módulo Elástico y Modulo Viscoso del tejido estudiado. Estos datos alimentarán simulaciones y permiten caracterizar en parte, la respuesta viscoelastica característica de los tejidos.

3.6. Caracterización de los Tejidos

Las propiedades mecánicas de la piel están determinadas principalmente por la geometría y la interacción de las redes de colágeno y elastina presentes en la dermis; las primeras son la fuente de la resistencia del tejido mientras que las segundas son responsables de la recuperación de la forma de la piel debido a la aplicación de esfuerzos.

La piel es un órgano estructural complejo que como muchos materiales biológicos presentan propiedades tanto elásticas como viscosas. Debido a esto se presenta un comportamiento no lineal en la relación esfuerzo-deformación y se genera un fenómeno de histéresis.

Las propiedades mecánicas de la piel se han estudiado primordialmente de forma no invasiva, utilizando pruebas de tensión, torsión, indentación y succión [Barel].

Los tejidos se caracterizarán mediante una prueba a tensión uniaxial, siguiendo en lo posible los requerimientos de la norma ASTM-638: Propiedades de Tensión a Plásticos, Tipo V según bibliografía revisada [Edsberg].

4. RESULTADOS

A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos en la experimentación.

Tabla 1. Resultados ensayo de tensión a probetas de piel humana en sentido transversal.

DIRECCIÓN TRANSVERSAL			
Probeta No	Carga Máxima (N)	Área Transversal (mm)	Modulo (Mpa)
1	233,85	19,40	33,91
2	311,89	18,92	22,83
3	285,50	18,99	43,64
4	308,45	18,99	44,93
5	392,17	20,32	60,07
6	374,17	17,21	34,18
7	315,21	16,07	63,23
8	311,00	21,844	41,56
9	425,18	21,18	39,14
10	429,93	20,97	35,33
Promedio	338,73	19,40	41,90
Desviación	63,85	1,80	12,20

Figura 10. Curva Esfuerzo – Deformación en piel humana obtenida en dirección transversal.

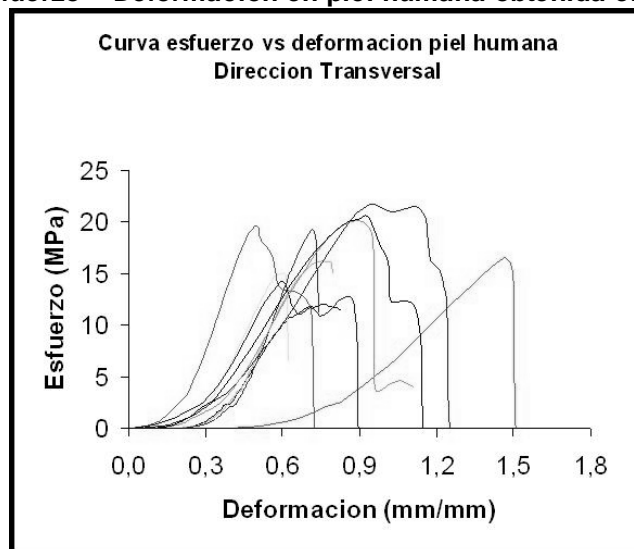
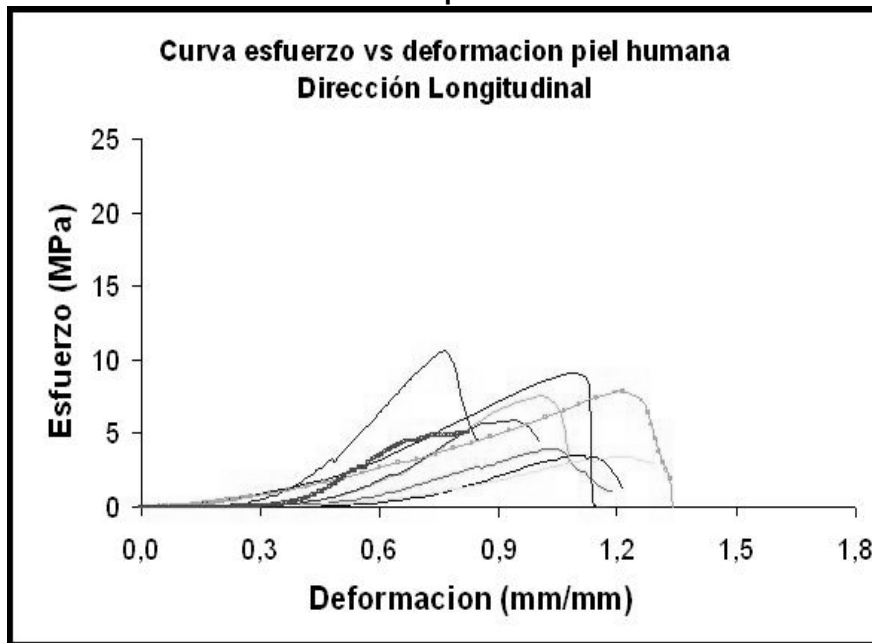


Tabla 2. Resultados ensayo de tensión a probetas de piel humana en sentido longitudinal.

DIRECCIÓN LONGITUDINAL			
Probeta No	Carga Máxima (N)	Área Transversal (mm)	Modulo (Mpa)
1	57,67	16,25	7,30
2	66,40	16,96	7,13
3	59,24	17,57	5,26
4	163,42	21,742	15,09
5	122,37	20,82	13,72
6	231,13	21,80	25,06
7	90,92	16,96	16,08
8	233,76	25,71	11,82
9	133,47	16,96	6,42
10	90,92	17,96	14,79
Promedio	124,93	19,27	12,27
Desviacion	66,05	3,10	6,04

Figura 11. Curva Esfuerzo – Deformación en piel humana obtenida en dirección longitudinal.



Habiendo escogido un $\alpha=0.05$, se concluye que las cargas máximas soportadas y el Modulo Difieren, por lo tanto, la dirección de corte **Sí** influye en el comportamiento mecánico del tejido.

Tabla 3. Resultados pruebas de tensión en SIS 2 capas con corte en dirección longitudinal

DIRECCIÓN LONGITUDINAL			
Probeta	Carga Máxima (N)	Área Transversal (mm ²)	Modulo (Mpa)
Promedio	6,276	3,293	3,453
Desviación	2,417	0,869	1,449

Figura 12. Curva Esfuerzo – Deformación en SIS bicapa obtenida en dirección transversal.

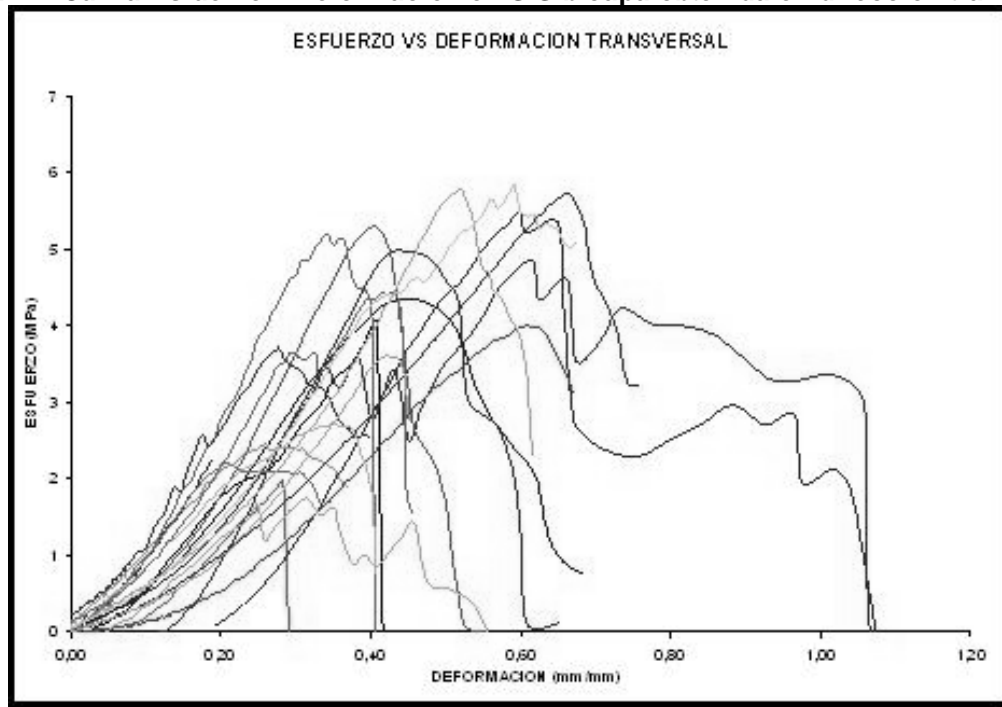


Figura 13. Curva Esfuerzo – Deformación en SIS bicapa obtenida en dirección longitudinal.

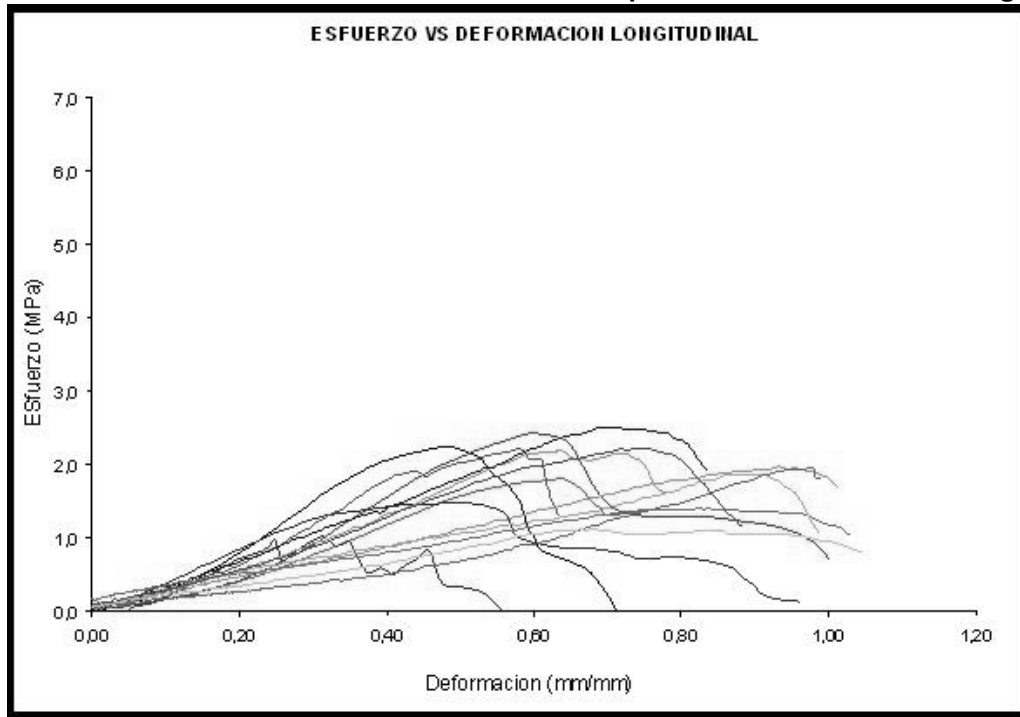


Tabla 4. Resultados pruebas de tensión en SIS 2 capas con corte en dirección transversal

DIRECCIÓN TRANSVERSAL			
Probeta No	Carga Máxima (N)	Área Transversal (mm ²)	Modulo (Mpa)
Promedio	10,827	2,504	12,295
Desviación	7,017	1,200	2,967

Habiendo escogido un $\alpha=0.05$, se concluye que las cargas máximas soportadas y el **Modulo Difieren**, por lo tanto, la dirección de corte **Sí** influye en el comportamiento mecánico del tejido.

Se realizaron unas pruebas preliminares para determinar el tiempo que se debía dejar “relajar” las bicapas de SIS en el ensayo de relajación de esfuerzos, para deformaciones del 5% de la longitud de cuello. La Figura 14 muestra los resultados obtenidos para probetas en corte longitudinal y transversal.

Figura 14. Tiempo de relajación de esfuerzos para SIS bicapa.

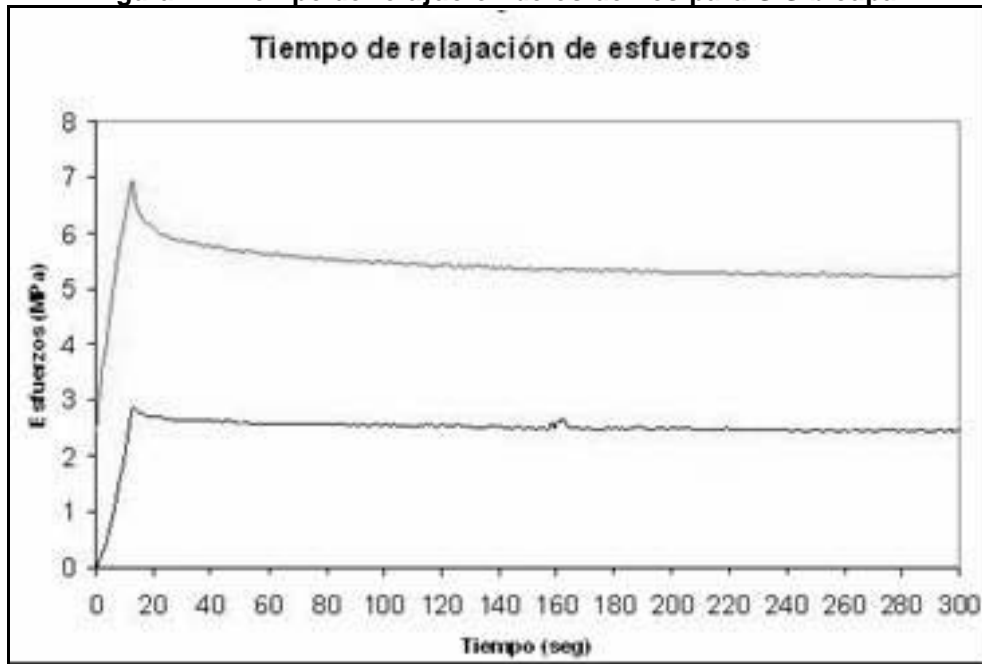


Figura 15. Curva relajación de esfuerzos en SIS bicapa con corte en dirección transversal.

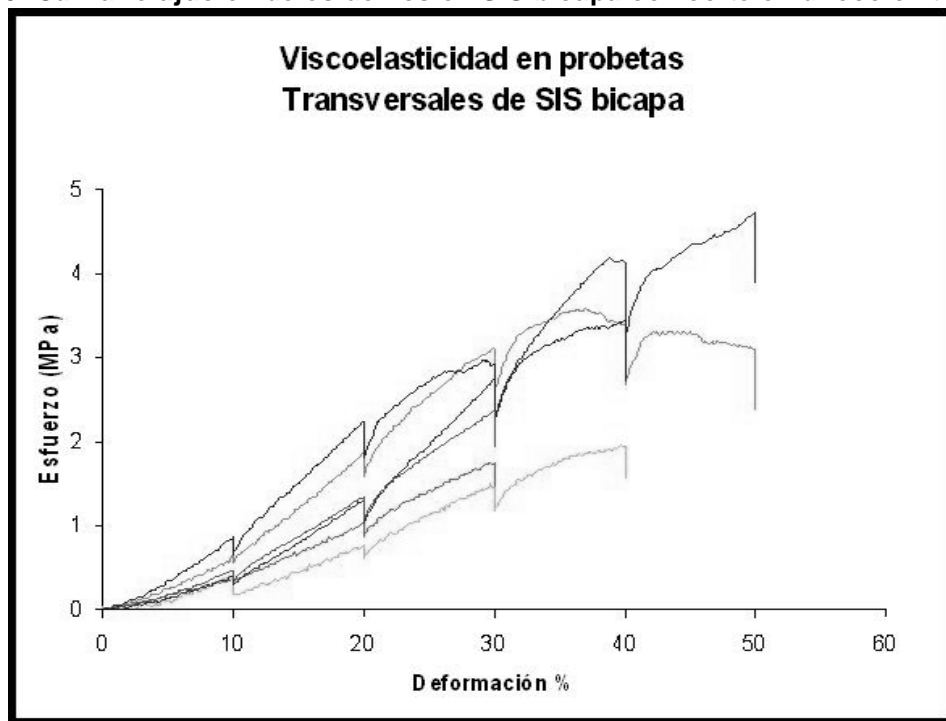
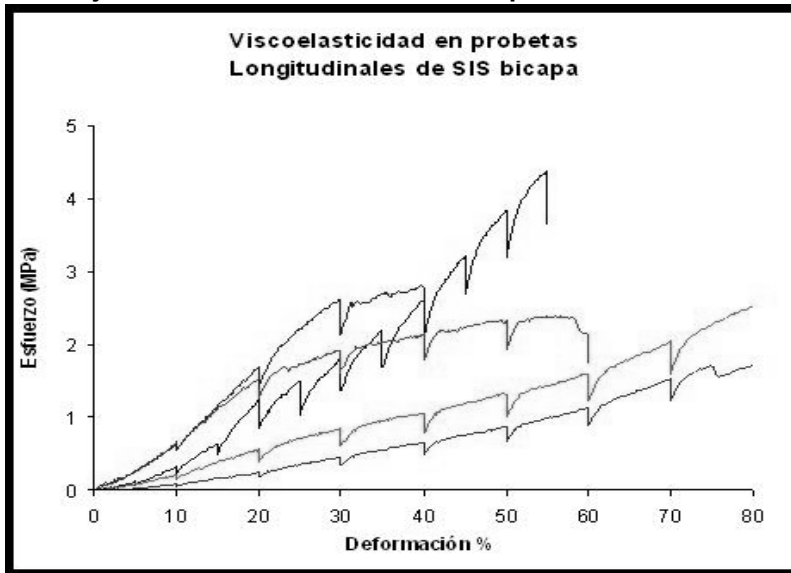


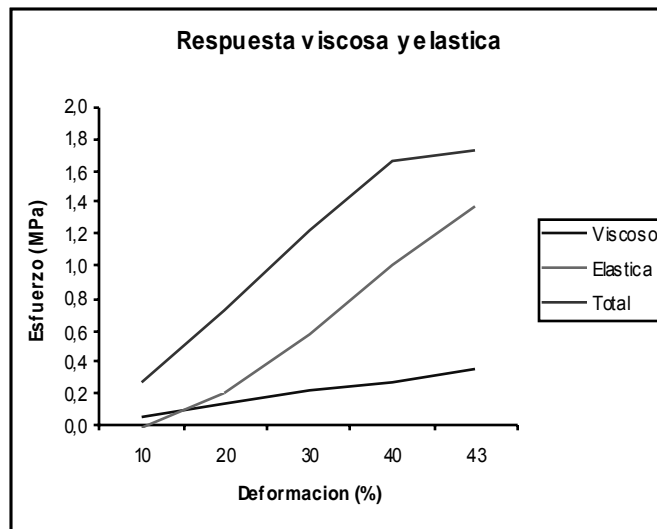
Figura 16. Curva relajación de esfuerzos en SIS bicapa con corte en dirección longitudinal.



Habiendo escogido un $\alpha=0.05$, se concluye que **NO** existe una diferencia significativa entre los módulos para cada dirección de corte en el ensayo de relajación de esfuerzos.

Al unir los puntos sobre cada una de las curvas, como se menciona en la metodología de experimentación, se obtienen unas rectas como las de la Figura 17.

Figura 17. Respuesta viscosa y elástica para SIS bicapa.



Los módulos para el comportamiento elástico y viscoso de cada una de las dos direcciones de corte para las SIS bicapa se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados pruebas de relajación de esfuerzos en SIS 2 capas con corte en dirección transversal y longitudinal

Módulos Dirección Transversal(Mpa)			
Parámetro	Total	Elástico	Viscoso
Promedio	0.69	0.59	0.12
Desviación	0.31	0.25	0.11

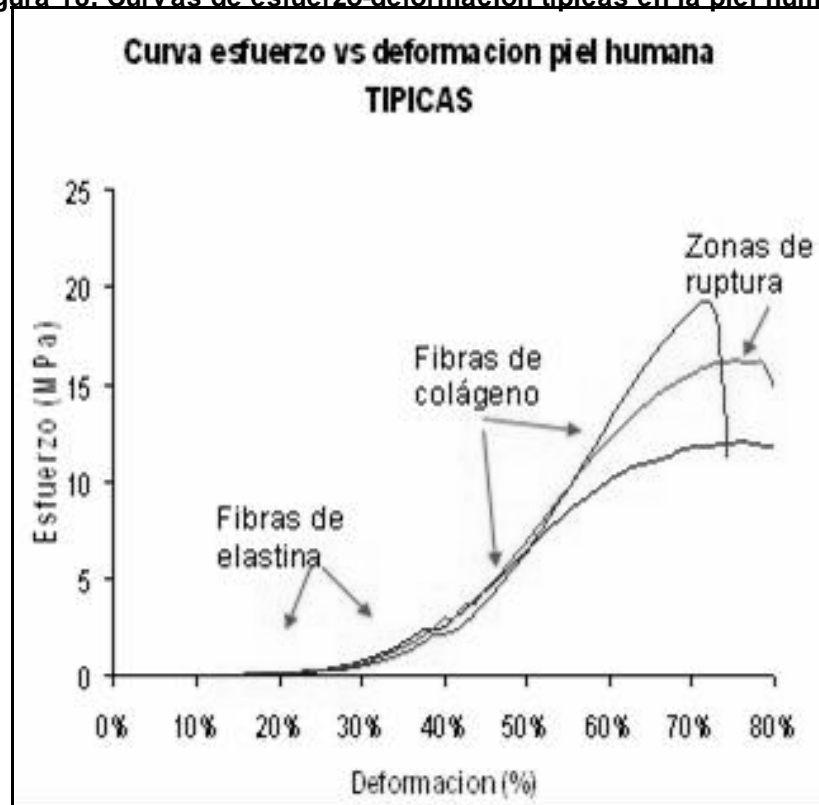
Módulos Dirección Transversal(Mpa)			
Parámetro	Total	Elástico	Viscoso
Promedio	0.45	0.36	0.11
Desviación	0.25	0.19	0.06

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Según la jerarquía estructural de la piel, se reconocen en el diagrama de esfuerzo-deformación tres zonas que responden claramente al comportamiento específico de ciertos constituyentes, como se puede ver en la Figura 18.

La primera región corresponde a la acción de las fibras de elastina que soportan todos los esfuerzos sobre el tejido y resisten la deformación. A partir de una deformación del 30% aproximadamente, se activan las fibras de colágeno, las cuales se empiezan a alinear de forma paralela o colineal con la dirección de la carga aplicada. Ya a partir de un 50 o 60% las fibras de colágeno se empiezan a desprender unas de otras dentro de los haces naturales y el proceso de ruptura se inicia lentamente hasta fallar completamente por el cuello.

Figura 18. Curvas de esfuerzo-deformación típicas en la piel humana.



El tener unas fibras que por la arquitectura misma del tejido estén alineadas de forma innata en una dirección particular, influye en la forma en que reaccionan durante la carga; existirán entonces diferentes comportamientos en las curvas esfuerzo-deformación según los distintos grupos de corte utilizados (longitudinal o transversal).

El patrón de la Figura 18 se puede ver en la Figura 10 y Figura 11. También es importante resaltar que existe una diferencia apreciable en el rango de ambos grupos de curvas; tendiendo ambas gráficas la misma escala se puede observar que las curvas del grupo de corte en dirección transversal son más “empinadas” o con un módulo más alto, mientras que las del grupo de corte en dirección longitudinal tienden a ser más “acostadas” o con módulos más bajos, como se puede ver en los datos de las tablas correspondientes a esta experimentación.

El encontrar diferencia significativa entre los dos grupos de corte, permite afirmar que la forma en que la piel resiste las cargas es de carácter anisotrópico; en este proyecto se escogieron sólo dos direcciones respecto a un eje definido (columna vertebral) pero se debería verificar los resultados de anisotropía haciendo pruebas a las probetas obteniéndolas en distintas direcciones (con una relación diferente a la ortogonal entre las direcciones de corte).

Analizando los dos grupos manejados en este proyecto, vemos que las probetas en dirección transversal resisten una mayor carga comparada con la dirección longitudinal, esto tiene lógica si pensamos en las estrías que se forman en el abdomen de las personas obesas ó las embarazadas.

Así mismo existe una diferencia significativa en el comportamiento de los dos grupos de corte en la SIS bicapa. Es importante mencionar que se utilizaron siempre submucosas intestinales porcinas de dos capas, pues el número utilizadas de éstas influye en la respuesta mecánica del soporte; siendo así se busco dejar fija esta variable y no interferir la experimentación con un grado mas de libertad. Una vez más el grupo de corte transversal mostró un comportamiento más resistente comparado con el grupo de corte longitudinal; los módulos también fueron distintos superando en magnitud el grupo transversal al longitudinal.

Según las investigaciones realizadas, podemos decir que de manera innata existe un direccionamiento preferencial de las fibras de colágeno en los tejidos estudiados, y esto se ve reflejado en el comportamiento frente a la carga aplicada. Cuando las fibras están por naturaleza coalineadas con el eje de aplicación de la carga, se puede ver que éste tejido resiste una mayor carga y tiene un mayor módulo.

Por otro lado, en el campo de relajación de esfuerzos, la Figura 14 muestra que alrededor de los 5 minutos de relajación, los esfuerzos se han acomodado por completo; esto se evidencia cuando la curva alcanza una meseta estable desde los 3 minutos aproximadamente. Este tiempo de 300 segundos fue el tiempo que se utilizó en los ensayos de relajación de esfuerzos para cada uno de los pasos al 5% de deformación consecutivos.

En el ensayo de relajación de esfuerzos, es importante que el practicante haya realizado ensayos de tensión antes, para poder tener valores aproximados de la deformación y el esfuerzo máximo soportados por el tejido antes de la falla. Durante este ensayo, es importante dividir la prueba en un número de incrementos de deformación suficiente de tal manera que garanticen por lo menos 5 puntos de las rectas para hallar los módulos y ante todo, evitar que la probeta falle durante alguna de las cargas.

La pendiente de la curva ELASTICA es una medida del estiramiento de las fibras de colágeno, mientras que la pendiente de la curva VISCOSA es una medida del deslizamiento de las fibras de colágeno entre sí. Si bien se estableció de forma preliminar un protocolo adaptado a las condiciones del CITEC y se lograron obtener datos coherentes, es necesario continuar practicando este experimento, para poder registrar de manera confiable las condiciones y métodos más adecuados. La determinación del comportamiento viscoelástico de los tejidos puede ser aplicada también a arterias y lograr obtener valiosa información que apoye y alimente los modelos computacionales que se llevan a cabo actualmente en el grupo de ingeniería biomédica, como lo es el estudio de la bifurcación de la carótida y patologías como la arteroesclerosis.

En cuando a avances en el área de reemplazo tisular, se deben realizar otros experimentos para encontrar la relación entre la orientación de las diferentes capas de SIS y la respuesta mecánica del tejido como un soporte completo. Sin duda, las propiedades de adhesión únicas que presenta la SIS, convierten este material en un excelente soporte no solo para el cultivo de diferentes tipos de células, sino para cubrir grandes regiones lesionadas.

Conocer algunas de las propiedades mecánicas de los tejidos, permite a los investigadores futuros avanzar en el área de regeneración tisular, cumpliendo con objetivos no sólo biológicos sino mecánicos y estéticos.

6. CONCLUSIONES

- ∅ Se encontraron datos que permite alimentar modelos computacionales y matemáticos, avanzando en el campo de la comprensión de los tejidos biológicos usados en reemplazos titulares y soportes.
- ∅ Se estableció una línea base para encontrar datos experimentales sobre viscoelasticidad. Es muy importante saber que definiendo una serie de protocolos, se puede adoptar tecnología y conocimientos desarrollados con anterioridad a las condiciones de trabajo que están a nuestro alcance.
- ∅ Por primera vez se trabajó el carácter viscoelástico de los biomateriales permitiendo abrir un nuevo aspecto en la investigación y desarrollo de estos materiales. Es necesario seguir estudiando materiales según los protocolos definidos en este proyecto, para ampliar el conocimiento de los tejidos y alimentar nuevos modelos computacionales.
- ∅ Existe evidencia para afirmar que hay diferencias en el comportamiento mecánico de los tejidos dependiendo de la dirección de corte debido principalmente dirección preferencial de alineación de fibras, determinada por la arquitectura misma del tejido.
- ∅ El comportamiento a tensión de los tejidos estudiados dependen claramente de la dirección de corte de la muestra. Los grupos estudiados evidencian este hecho y se corrobora mediante métodos estadísticos.
- ∅ No se encontró diferencia significativa en el comportamiento viscoso de los tejidos estudiados dependiendo del corte de la probeta.

7. REFERENCIAS

1. Badylak S.F. 2002. "The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction". *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Vol 13; pp 377-383.
2. Barel A. O., Lambrecht R., Clarys P. "Mechanical Function of the Skin: State of the Art." *Laboratory of General and Biochemical Chemistry, Faculty of Physical Education and Physiotherapy, Vrije Universiteit Brussels, Belgium*
3. Borrás M.X. "Crecimiento tridimensional de fibroblastos: Microcultivos por capas de submucosa intestinal de porcino SIS". Trabajo de grado Magister en Ciencias Biomédicas, Universidad de los Andes. Bogotá-Colombia.
4. Brown-Etris M, Cutshall W. "A new biomaterial derived from Small Intestine Submucosa and Developed into a Wound Matrix Device".
5. Edsberg L, Cutway R. Microstructural and mechanical characterization of human tissue and adjacent to pressure ulcers.
6. Freshney I. "Culture of animal cells: a manual of basic technique." 4ta Edición. John Wiley, 2000.
7. Lanza R.P. 1997. "Principles of Tissue Engineering". Editado por, Langer R y Vacanti J. Academic Press-R.G. USA. C.2000: 857-902
8. Lindberg K, Badylak S.F. 2001. "Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins". *Burns*. Vol 27; pp 254-266.
9. Reihnsner R, Balogh B, Menzel E.J. 1995. "Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the in vivo configuration". *Medical Engineering Phys*. Vol 17; No 4; pp 304-313.
10. Silver F, Siperko L. 2003. "Review: Mechanobiology of force transduction in dermal tissue". *Skin Research and Technology*. Vol 9; pp 3-23.
11. Tabima D. 2003. "Desarrollo de una metodología para la preparación y evaluación de matrices biodegradables usadas para el crecimiento de

fibroblastos.” Trabajo de grado Magister en Ingeniería Mecánica, Universidad de los Andes. Bogotá-Colombia.

12. Garat J.M. 2004. “Aplicaciones de la Ingeniería Tisular en Urología”. El Diario Médico. Pp 8-9.