

ESTUDIO DE LA REMODELACIÓN DE LA PARED ARTERIAL USANDO
SOPORTES DE SIS

RICARDO BELTRÁN

ASESOR
JUAN CARLOS BRICEÑO Ph.D.
INGENIERÍA MECÁNICA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE MECÁNICA

2007

1	MARCO TEORICO	10
1.1	Tejido Vascular	10
1.2	Ingeniería de Tejidos	12
1.3	Cardiopatías	14
1.4	Interacción en Diferentes Biomateriales	14
1.5	Submucosa Intestinal Porcina (SIS)	16
1.6	Entrecruzamiento de Colágeno y Heparina	18
1.7	Pruebas Mecánicas	19
2	METODOLOGIA	22
2.1	Elaboración de Conductos de Submucosa Intestinal (SIS)	22
2.1.1	Materiales y Reactivos	22
2.1.2	Procedimiento No. 1: Obtención de SIS.	23
2.1.3	Procedimiento No. 2: Elaboración de Conductos	23
2.1.4	Procedimiento No. 3: Fijación de heparina	24
2.2	Caracterización de Conductos	25
2.2.1	Pruebas Mecánicas	25
2.2.2	Pruebas Histopatológicas	25
2.3	Modelo In Vivo	26
2.4	Evaluación del Desempeño (no invasivo)	27
2.5	Evaluación del Desempeño (invasivo)	28
2.5.1	Pruebas Mecánicas	28
2.5.2	Pruebas Histopatológicas	28
3	RESULTADOS	30
3.1	Elaboración de Conductos	30
3.2	Caracterización de Conductos Vasculares	31
3.2.1	Pruebas Mecánicas	31
3.2.2	Pruebas Histopatológicas	38
3.3	Evaluación del Desempeño (no invasivo)	39
3.4	Evaluación del Desempeño (invasivo)	39
3.5	Modelo In Vivo	46
4	ANALISIS DE RESULTADOS	47

4.1	Elaboración de Conductos Vasculares	47
4.1.1	Membranas de Submucosa Intestinal (SIS)	47
4.1.2	Conductos de Submucosa Intestinal (SIS)	47
4.2	Caracterización de los conductos de SIS	48
4.2.1	Pruebas Mecánicas	48
4.2.2	Pruebas Histopatológicas	49
4.3	Modelo in vivo	49
4.3.1	Evaluación del Desempeño (no invasivo)	50
4.3.2	Evaluación del Desempeño (invasivo)	50
5	CONCLUSIONES.....	53

Lista de Figuras y Tablas

- Figura 1. Recuperación del tejido vascular con los implantes disponibles actualmente [11].
- Figura 2. Conductos de Submucosa Intestinal en su forma deshidratada.
- Figura 3. Curva esfuerzo – deformación promedio en conductos de 4 capas de SIS deshidratada para 3 distintas orientaciones.
- Figura 4. Aproximación del módulo de elasticidad en la región inicial en conductos de 4 capas de SIS deshidratada para 3 distintas orientaciones.
- Figura 5. Aproximación del módulo de elasticidad en la segunda pendiente.
- Figura 6. Deformación máxima promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS deshidratados para 3 distintas orientaciones.
- Figura 7. Esfuerzo último promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS previamente hidratados para 3 distintas orientaciones.
- Figura 8. Curva esfuerzo – deformación en conductos de SIS de 4 capas previamente hidratados.
- Figura 9. Aproximación del módulo de elasticidad en la región inicial en conductos de 4 capas de SIS deshidratada para 3 distintas orientaciones.
- Figura 10. Deformación máxima promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS previamente hidratados para 3 distintas orientaciones.
- Figura 11. Esfuerzo último promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS previamente hidratados para 3 distintas orientaciones.
- Figura 12. Curva esfuerzo – deformación en conductos de SIS de 2 capas deshidratados.
- Figura 13. Aproximación del módulo de elasticidad en conductos de SIS de 2 capas deshidratados.
- Figura 14. Curva esfuerzo - deformación en conductos de SIS de 2 capas previamente hidratados.
- Figura 15. Aproximación del módulo de elasticidad en conductos de SIS de 2 capas previamente hidratados.
- Tabla 1. Resultados de las pruebas mecánicas en conductos de SIS de 2 y 4 capas, hidratados y deshidratados.

Figura 16. Tinción de Hematoxilina – Eosina en conducto de SIS después de su fabricación.

Figura 17. ECO practicado a los 45 días de implantación del dispositivo

Figura 18. Curva esfuerzo – deformación de la carótida distal, proximal y el injerto explantado a los 180 días.

Figura 19. Tinción con Hematoxilina y Eosina en la frontera de la anastomosis. El injerto es el de la izquierda y se aprecia la menor densidad celular.

Figura 20. Tinción con Hematoxilina y Eosina en el injerto se aprecian las 3 capas íntima, media y adventicia desde las izquierda hacia la derecha.

Figura 21. Tinción tricrómico elástica donde se ve la orientación de las fibras longitudinales y transversales.

Figura 22. Tinción tricrómico elástica donde se ven las fibras de músculo liso.

Figura 23. Tinción tricrómico elástica en la frontera de la anastomosis.

Figura 24. Comportamiento de la velocidad de onda (C_o) obtenida con el módulo de elasticidad de los injertos y las carótidas distales explantadas. La escala derecha es el indicador de velocidad para los injertos antes de implantar.

Figura 25. Comportamiento de la impedancia (Z_o) obtenida con el las velocidades de onda (C_o) de los injertos y las carótidas distales explantadas. La escala derecha es el indicador para los injertos antes de implantar.

Figura 26. Comportamiento de la distensibilidad (C) obtenida con el las velocidades de onda (C_o) de los injertos y las carótidas distales explantadas. La escala derecha es el indicador de para los injertos antes de implantar.

Figura 27. Comportamiento de la velocidad normalizada (C_o/C_o) esta gráfica indica cuantas veces es mayor la velocidad del flujo en el injerto en comparación con la arteria.

Figura 28. Comportamiento de la impedancia normalizada (Z_o/Z_o) esta gráfica indica cuantas veces es mayor la resistencia del flujo en el injerto en comparación con la arteria.

Figura 29. Comportamiento de la distensibilidad normalizada (C/C) esta gráfica indica cuantas veces es mayor la elasticidad de la arteria en comparación con el injerto.

Figura 30. Comportamiento del cambio de la distensibilidad (C) con el cambio de la velocidad de onda (C_0) en los injertos explantados.

INTRODUCCION

El tratamiento quirúrgico de diversas patologías congénitas cardiacas (atresia pulmonar, tetralogía de Fallot, etc), así como el tratamiento de diversas patologías en el adulto, como la revascularización coronaria, requiere el uso de diferentes materiales para crear nuevas vías o en algunos casos, cerrar los defectos.

En los años 2004 y 2005 se atendieron en la Fundación Cardio-Infantil Instituto de Cardiología (FCI IC) 11 pacientes con atresia y estenosis pulmonar, 128 pacientes con tetralogía de Fallot, 561 pacientes con defecto del tabique auricular y 540 pacientes con defectos de tabique ventricular.

Desde enero de 2004 hasta mayo de 2006 se llevaron a cabo en la FCI IC 1082 intervenciones de revascularización. La dificultad para encontrar donantes con el fin de hacer el reemplazo exige el uso de tejidos criopreservados, materiales sintéticos y naturales de tal forma que puedan ser utilizados en injertos vasculares.

Los materiales sintéticos más utilizados son Dacrón y PTFE, las prótesis de PTFE son químicamente inertes y no inducen respuestas alérgicas o inflamatorias, además que son hidrofóbicas pero aun así la complicación mas frecuente es la trombosis precoz o tardía. En este tema existe un acuerdo en común, que estipula que si la sangre circula por debajo de una velocidad mínima determinada irremediablemente aparecerá una trombosis. Hay factores que se derivan de este acuerdo como lo son la permeabilidad de la prótesis y el diámetro.

La ventaja de utilizar injertos autólogos es básicamente que la respuesta del hospedero es más amable, no existe oclusión en diámetros de 4 mm y puede permanecer abierto con flujos de solo 75 ml/min el cual debe ser mayor para mantener estas características con materiales sintéticos.

Con base a estas condiciones se pretende utilizar un material xenológico, el cual tiene condiciones intermedias entre el injerto autólogo y sintético. De esta forma se espera que se pueda utilizar en diámetros inferiores a 6 mm, con gran aceptación por parte del hospedero al tratarse de matriz extracelular y por último que estimule la regeneración celular.

Para esto se parte de una metodología propuesta para la obtención de submucosa intestinal porcina, y se desarrolla una metodología flexible para convertir estas membranas en conductos cilíndricos de diferentes diámetros y geometrías. Se realizan pruebas mecánicas, e histopatológicas con las cuales se obtienen las características de los conductos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar un estudio detallado donde se demuestre que los conductos de submucosa intestinal porcina promueven la regeneración celular en el tejido vascular permitiendo la remodelación del mismo y observando el progreso en el tiempo.

Objetivos Específicos

- Diseñar un modelo in vivo que permita el estudio de la remodelación de la pared arterial en un animal en crecimiento.
- Caracterizar mecánicamente los conductos.
- Caracterizar histológicamente los conductos.
- Aplicar un modelo de flujo mecánico a las condiciones del modelo in vivo que permita tomar mediciones discretas sobre las características del conducto.
- Analizar de acuerdo a los resultados del modelo in vivo la viabilidad de los conductos.

1 MARCO TEORICO

1.1 *Tejido Vascular*

El tejido vascular consta de 3 capas; íntima, media y adventicia, las cuales reaccionan de distinto modo ante los diferentes factores que inducen cambios patológicos.

La capa íntima de las arterias es de calibre mediano y esta constituida por un endotelio, esta descansa sobre una capa de tejido conjuntivo que la separa de la lámina elástica interna y de la media. La capa endotelial es la barrera principal a las proteínas plasmáticas y también secreta muchos productos vasoactivos. De esta forma tiene 2 trabajos fundamentales; mantener la compatibilidad con la sangre para prevenir a adhesión de varias especies a la pared de los vasos y la selectiva permeabilidad de sustancias tales como agua, electrolitos, azúcares y otros que pasan desde el flujo sanguíneo a los por medio de los vasos a los tejidos.

A través del endotelio pasan sustancias necesarias para el metabolismo, esta se compone de células planas con un núcleo abultado y se encuentran situadas según un patrón escamoso en sentido al flujo. La capa subendotelial es una superficie delgada y completa de tejido conjuntivo que contiene fibras de colágeno y fibras elásticas delgadas.

Con el paso del tiempo esta capa se va engrosando progresivamente, debido a la proliferación de tejido conjuntivo y desde el punto de vista mecánico no tiene ningún efecto general en las propiedades elásticas de los vasos.

La membrana elástica interna suele ser una banda única, homogénea ondulada y sin solución de continuidad enrollada alrededor del vaso, separando la íntima de la media. Cuando el vaso esta distendido las ondulaciones desaparecen y la capa aparece como una membrana plana. Hay que anotar que la membrana elástica está bastante dentro de la zona de difusión de los nutrientes procedentes de la luz.

En la capa media se encuentra tejido elástico de forma difusa por la proporción de fibras musculares y de tejido elástico a las cuales debe sus características. En la medida que disminuye el diámetro de las arterias así mismo

disminuye progresivamente el contenido de la capa elástica, el caso de la aorta sería de una arteria elástica y el de carótida se considera arteria muscular. Las arterias musculares están constituidas fundamentalmente por un plano de células musculares y una escasa cantidad de fibras elásticas orientadas circularmente y en menor cantidad longitudinalmente.

La capa adventicia tiene gran importancia ya que es la que provee fortaleza a la arteria y tiene características reconstructivas, está constituida en su mayoría por tejido muscular y en algunos casos llega a ser más gruesa que la media. Esta capa además es la encargada de llevar los vasos sanguíneos, comúnmente denominados vasa vasorum. Esto comprende arteriolas aferentes, un plexo capilar y vénulas y venas eferentes. Se complementa con un sistema de capilares y vasos linfáticos.

Los vasos tienen una clasificación según la función extra que deben desempeñar de esto depende la variación en su composición de endotelio, músculo liso, tejido elástico y tejido conectivo. De acuerdo con las composiciones se pueden clasificar en arterias elásticas, arterias musculares, vasos de resistencia, vasos de intercambio y vasos capacitores, en este caso las interés son las de diámetro superior a los 2 mm.

Las arterias elásticas tienen un diámetro de 1 a 2 cm, estas son la arteria pulmonar, la aorta y ramas mayores como las iliacas. Tienen una gran capacidad para distenderse debido al alto contenido de elastina en la túnica media lo que proporciona la capacidad para recibir el volumen latido proveniente de la eyección del ventrículo izquierdo y así mismo contraerse durante la diástole. Por otro lado la túnica media está compuesta por una malla de colágeno y tiene la función de limitar la extradistensibilidad que pueda proporcionar la precarga.

Las arterias musculares varían en diámetro desde 0,1 hasta 1 cm y ejemplos de estas son arterias medianas y pequeñas como la poplítea, radial y coronarias. Estas arterias contienen gran músculo liso y actúan como conductos de baja resistencia, sus paredes gruesas previene el colapso en situaciones donde se deben hacer dobleces agudos por ejemplo en la rodilla [1].

1.2 Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos propone el desarrollo in vitro de tejidos y órganos que puedan ser transplantados a aquellos pacientes que lo requiera. La ingeniería de tejidos empezó como un método para estudiar el comportamiento de las células animales libre de variaciones que pueden ocurrir entre el estudio cuando el animal se encuentra en homeostasis normal como cuando se realiza un experimento. Como su nombre lo indica, las primeras técnicas empleadas fueron la deagregación de fragmento de tejido, y el crecimiento era restringido a la migración de las células desde los fragmentos de tejido al medio del cultivo [2].

Las células empleadas en la ingeniería de tejidos son de origen animal o humano, pueden ser aisladas de su ambiente natural o manipuladas genéticamente [3]

Las células que se emplean pueden ser autólogas, esto quiere decir que son tomadas del individuo que será el receptor final. Alogénicas las cuales son células de la misma especie del receptor final y por último son las xenogénicas la cuales proviene de una especie diferente a la del receptor final.

En la gran mayoría de casos es preferible utilizar células autólogas debido a que son las menos propensas al rechazo del sistema inmune, sin embargo es difícil esperar tener un cultivo de estas células por los largos periodos de tiempo necesarios. Las células alogénicas por otro lado tienen una respuesta por parte del hospedero y así mismo su disponibilidad sigue siendo limitada.

Las células xenogénicas tienen una alta disponibilidad pero aun presentan el problema de la respuesta inmune.

La meta de los primeros biomateriales, consistía en alcanzar una combinación de funcionalidad respecto al uso que se le da, sin deteriorar la respuesta ante el hospedero. En la primera generación los biomateriales se seleccionaban por sus características inertes, así tenían una respuesta mínima frente al tejido hospedero. Después se habló de biomateriales de segunda generación, estos incluían una respuesta controlada en los tejidos en los cuales serían incluidos y proporcionaban una ventaja en el uso terapéutico. Además se empezó a hablar de biomateriales reabsorbibles y su degradación dependía de la aplicación del dispositivo, por esta razón muchos grupos de trabajo desarrollaron

polímeros biodegradables con diferentes características de resistencia, flexibilidad y composiciones químicas.

Se desarrollaron nuevas superficies de ingeniería y arreglos arquitectónicos para diferentes aplicaciones y así se llegó a la tercera generación de biomateriales, que consistía en estimular reacciones muy específicas con proteínas y células a nivel molecular buscando crear tejido funcional.

La ingeniería de tejidos utiliza herramientas que interactúan entre la biomédica y la ingeniería con el fin de utilizar células o atraerlas para formar tejidos o regenerarlos. Como se dijo anteriormente las células pueden provenir de tejido alogénico, xenogénico o autólogo, un fenotipo y ciertas condiciones. El soporte debe tener unas propiedades mecánicas, una arquitectura característica, señales biológicas y cierta tasa de reabsorción. Por último el bioreactor proporcionará las condiciones para la maduración *in vitro*, mediante factores de crecimiento, estímulo mecánico y nutrientes. En definitiva en el bioreactor se llevará a cabo la proliferación de las células, arreglo y proliferación, seguido de la producción de la matriz extracelular. Se pretende que *in vivo* se degrade el soporte y ocurra una remodelación del tejido [4].

El reto es proporcionar alternativas que se asemejen a los tejidos naturales de forma funcional y estructural con alta disponibilidad de geometrías y tamaños. Basados en esta tecnología se trabaja con un ángulo diferente en matrices naturales descelularizadas, con estos soportes se trabajó con el fin de remodelarlos *in vitro* y se ha demostrado que se remodelan *in vivo*.

En el campo cardiovascular se ha hecho una diferencia fundamental en las estrategias de la ingeniería de tejidos. Las opciones prácticamente se dividen entre tejidos decelularizados y matrices sintéticas, hasta que recientemente una ventaja significativa ha sobresalido en los conductos decelularizados donde se ha demostrado que mantiene la integridad a corto plazo en los conductos para reemplazos de vasos pequeños. [5]

Estos dispositivos han demostrado excelentes resultados en cuanto a su funcionalidad en modelos *in vivo*.

1.3 Cardiopatías

Entre las más comunes, la tetralogía de fallot ocupa el 10% de todas las cardiopatías congénitas se ha logrado reparar satisfactoriamente por cuatro décadas pero algunos de estos pacientes tienen que regresar siendo adultos para ser reoperados [6]. El defecto es el resultado del desplazamiento anterior del septum infundibular durante el desarrollo, resultando en la obstrucción del flujo de salida del ventrículo derecho. La aorta es desplazada hacia el septum ventricular como consecuencia se da la hipertrofia del ventrículo derecho. La obstrucción al flujo de sangre pulmonar es por lo general a varios niveles, los que pueden incluir estenosis subvalvular, valvular, y supravalvular. La válvula pulmonar se malforma frecuentemente y el diámetro es mas pequeño, se puede presentar hipoplasia de las arterias pulmonares si la obstrucción es severa y por lo general hay estenosis de la rama de las arterias pulmonares por conductos primarios o secundarios.

Los pacientes que se les practica procedimientos de conductos en su niñez para incrementar el flujo de sangre pulmonar, conllevan su condición si la oxigenación durante su crecimiento es adecuada.

Los pacientes con atresia pulmonar pueden sobrevivir hasta la edad adulta sin ninguna cirugía porque tienen un adecuado flujo sanguíneo de las arterias colaterales. Dependiendo de los conductos puede presentarse estenosis proximal o distal en las arterias pulmonares si es reparado puede quedar un defecto residual en el ventrículo, una obstrucción entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar y otros problemas en la válvula tricúspide. Con el fin de tener un saturación arterial de 75% a 84%, estos pacientes con una combinación arterial y venosa [7]

1.4 Interacción en Diferentes Biomateriales

El aspecto más importante en cuanto a las respuestas patológicas de los implantes poliméricos químicamente puros, es que no se conocen respuestas inflamatorias o alérgicas. En principio se presenta una agregación de macrófagos por la respuesta a cuerpo extraño pero con el tiempo suele disminuir, las células

responden con la penetración de fibroblastos los cuales se incorporan al interior de la pared.

Desde hace tres décadas se han venido utilizando materiales sintéticos para injertos vasculares, los comúnmente utilizados PTFE y Dacrón, pero estos materiales resultan exitosos en reemplazos para diámetros de 6 mm en adelante. En general se han utilizado todo tipo de materiales como son los polímeros mencionados anteriormente, metales, cerámicos, carbonos, colágeno procesado y tejidos animales o humanos químicamente tratados, ejemplos son válvulas aórticas preservadas en glutaraldehído, pericardio y vasos sanguíneos. Las complicaciones de los dispositivos médicos independiente del sitio de implantación se pueden agrupar en seis grandes categorías; trombosis y tromboembolismos, infección asociada al dispositivo, recuperación defectuosa, falla del biomaterial, interacción adversa del tejido como lo es toxicidad o hemólisis y por último efectos adversos del biomaterial como la migración o la hipersensibilidad sistémica [8]. No existe un material ya sea sintético o con una superficie biológica modificada que sea tan tromboresistente como el endotelio sano. Los materiales extraños al contacto con la sangre absorben una película de componentes de plasma, principalmente proteínas seguido de una adhesión plaquetaria [9]. Para los materiales sintéticos la velocidad mínima determinada es mayor y por esta razón no se presentan porcentajes clínicamente aceptables por debajo de los 6 mm [10].

Las prótesis de tela exhiben una gran cantidad de tejido fibroso en las anastomosis como una sobrerrespuesta fisiológica a la reparación [11]. En general los conductos vasculares sintéticos y biológicos fallan con mayor frecuencia por la estrechés generalizada o localizada en los sitios de la anastomosis debido a la proliferación de tejido conectivo en la íntima. La hiperplasia intimal resulta principalmente de la migración de células de músculo liso, proliferación y seguido de la elaboración de la matriz extracelular. Los factores que contribuyen a estos fenómenos son la trombogenicidad de las superficies, endotelización tardía o incompleta del material, flujo turbulento a través de la anastomosis y factores mecánicos en la unión del implante y el tejido hospedero.

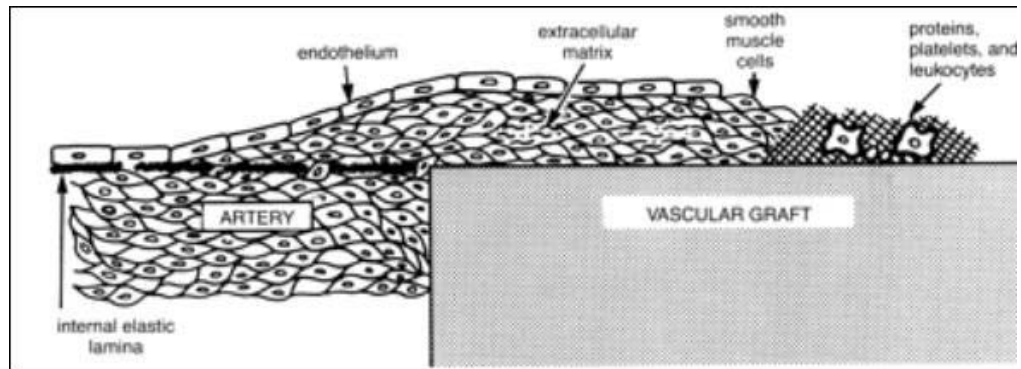


Figura 1. Recuperación del tejido vascular con los implantes disponibles actualmente [11].

Los materiales degradables exigen aplicaciones de corto tiempo así que requieren solo una presencia temporal en el organismo. Una ventaja adicional de estos materiales es que pueden mitigar algunos problemas relacionados con la seguridad a largo plazo. Entre las aplicaciones más comunes de estos materiales poliméricos biodegradables se encuentran las suturas, los sistemas de liberación de drogas, dispositivos para fijaciones ortopédicas, sistemas de prevención de adhesión y conductos vasculares temporales y stents.

Los usos de un soporte degradable son recomendados en circunstancias en que el tejido natural ha sido debilitado por enfermedades, lesiones o cirugía y requiere un soporte artificial. Entre los problemas se encuentran los vasos lesionados y los conductos vasculares serían un ejemplo de los dispositivos correspondientes para soporte. [12]

1.5 Submucosa Intestinal Porcina (SIS)

La matriz extracelular es un material biológico producido por las mismas células la cual se encuentra entre estas y les da soporte. Las mantiene unidas por medio del soporte físico y les proporciona adherencia, además pueden enviar señales entre ellas e interactuar por medio de la matriz. Esta consiste en grandes moléculas sintetizadas por las células, que son llevadas a los espacios intercelulares y después son unidas para crear un soporte estructural compuesto

por colágeno y elastina en su gran mayoría y proteoglicanos, glicoproteínas los cuales proporcionan adhesión, algunos solutos y agua.

Entre sus funciones principales se encuentra el soporte mecánico para que la célula se pueda anclar, determina la orientación de la célula, controla su crecimiento, mantiene la diferenciación, da una plataforma para remodelar el tejido de forma ordenada y establece un micro ambiente para el tejido.

La submucosa intestinal es un material natural obtenido del intestino delgado de porcinos, esta es una capa muy delgada constituida por tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Este material es propiamente matriz extracelular y en su estructura proteica contiene específicamente 90% de colágeno tipo I y III y en menor proporción colágeno IV, V y VI. Entre las proteínas especializadas se encuentran Fibronectina, factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 y factor β de transformación (TGF- β) y por último entre los proteoglicanos hay heparina y heparan sulfato [2].

EL colágeno es la proteína más común en el reino animal, existen cerca de 20 tipos diferentes de colágeno pero el tipo I, II y III los cuales son intersticiales o fibrilares, son los más abundantes, estos son utilizados ampliamente en cultivos celulares y al existir pequeñas variaciones no es reconocido como extraño entre especies. Los Tipos IV, V y VI son no fibrilares y están presentes en las membranas basales [4].

La fibrinectina es una glicoproteína de multidominio que posee sitios de uniones para una gran variedad de componentes de la matriz extracelular como lo son el colágeno, Heparina A y B y fibrina. Esta se encuentra en el tejido conectivo, en el plasma y alrededor de la superficie de las células y es muy importante por su carácter adhesivo en la matriz extracelular y en las células endoteliales que migran.

Entre las ventajas que ofrece este material, es su resistencia y la capacidad de ser remodelado por el hospedero después de ser implantado. Las células del hospedero para un tejido específico, pueden crecer sobre el soporte dependiendo de su ubicación en el trasplante y por esta razón se puede utilizar exitosamente en injertos para conductos vasculares.

Las membranas de SIS son preparadas removiendo la capa serosa, invirtiendo el material, y removiendo la superficie mucosa. La submucosa remanente constituye el material para el conducto [13].

Esta submucosa es una estructura acelular que promueve relativamente poca inmunogenicidad entre diferentes especies [14].

Estas características hacen de la SIS un material idealmente natural y estudios preliminares sugieren que puede ser un material muy favorable para la regeneración tisular.

Se ha logrado suturar la SIS y darle una forma tubular y ha sido implantado haciendo una anastomosis en la arteria carótida de caninos. Las pruebas mecánicas a través del tiempo parecen parecerse cada vez mas a las de la arteria carótida nativa, los angiogramas muestran flujo uniforme sin dilatación a los dos meses, y la capa íntima de los injertos explantados se ve blanca, brillante y lisa. [15]

Se ha comparado el desempeño post operatorio de los conductos de SIS contra los de PTFE y vena safena en diámetro pequeños (3,5 – 5,0 mm) y la permeabilidad de los conductos de SIS resultó ser muy superior. En los conductos SIS a los 7 días se podía observar una malla delgada (30 μm) de fibrina y a los 28 días había presencia de células endoteliales que cubrían la fibrina [16, 17].

Inclusive se les han dado tratamientos superficiales como fijar la heparina a al colágeno de tal forma que puedan ser utilizado en diámetros pequeños y se mantengan tromboresistentes. [18]

Otro aspecto en el que los conductos de SIS han demostrado un resultado prometedor es en la resistencia a la infección, en comparación con conductos de PTFE donde a raíz de la infección hubo oclusión. [19]

1.6 Entrecruzamiento de Colágeno y Heparina

La heparina es un glicosaminoglicano formado por d-glucosamina y ácido iurónico unidos por enlaces glicosídicos. Es un ácido fuerte y tiene una alta afinidad por grupos de cargas positivas, debido a su alto contenido de sulfatos y grupos de ácido carboxílico. Es una molécula capaz de formar complejos con la

antitrombina III, activándola y potenciando su efecto para evitar la formación de trombos, al inhibir la trombina. El complejo formado por éste glicosaminoglicano y la antitrombina inactiva enzimas de coagulación como los factores IIa, Xa, IXa, XIa y XIIa.

Mediadores EDC/NHS:

1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC) es un agente de entrecruzamiento de distancia cero usado para unir grupos carboxílicos a grupos aminos primarios. En presencia de *N*-hidroxisuccinimide (NHS) la formación de estos enlaces se hace permanente.

El mecanismo de reacción tiene varios pasos, en primera instancia se activan los grupos carboxílicos formando intermediarios con la molécula de EDC, al agregar el mediador NHS se produce un segundo intermediario semi estable que reacciona inmediatamente con grupos aminos primarios para obtenerse un enlace tipo amida altamente estable que no es afectado por la presencia de agua.

El uso de los dos mediadores simultáneamente permite crear enlaces peptídicos y similares entre moléculas que contengan grupos de ácido carboxílico y otras que contengan grupos aminos primarios, sin importar la estructura del compuesto.

En estudios realizados en los Países Bajos se encontró que el porcentaje máximo que se puede ligar de heparina a colágeno puro extraído de tendón de Aquiles es de 5.5% (p/p), de forma análoga en estudios realizados en la Universidad de los Andes se observó un máximo de 5.12% (p/p) de heparina en SIS. Esta cantidad se obtiene al establecer las razones molares óptimas de trabajo como: 2.4:1 (hep-COOH:coll-NH₃), 2.4:1 (EDC :hep-COOH) y 0.6:1 (NHS:EDC) a presión y temperatura ambiente, pH de 5.5, con un volumen de reacción de 188.3mL por gramo de SIS y un tiempo de preactivación de 10 minutos para un tiempo de reacción de 2 horas [20].

1.7 Pruebas Mecánicas

El esfuerzo y la deformación de ingeniería en una prueba de tensión son definidas relativo al área y longitud original del espécimen de prueba. Estos valores son de interés ya que el diseñador espera que las deformaciones

experimentadas por cualquier componente del producto no cambien su forma significativamente.

La curva esfuerzo – deformación varía según el material y el esfuerzo de ingeniería en cualquier punto de la curva es definido como la fuerza dividida el área original:

$$\sigma_e = \frac{F}{A_0}$$

Donde σ_e es el esfuerzo de ingeniería en MPa (lb/in².), F es la fuerza aplicada durante la prueba en N (lb), y A_0 es el área original del espécimen de prueba en mm² (in².). La deformación de ingeniería en cualquier punto de la prueba es dado por:

$$e = \frac{L - L_0}{L_0}$$

Donde e es la deformación de ingeniería en mm/mm (in./in.), L es la longitud en cualquier punto durante la elongación, mm (in.), y L_0 es la longitud original entre mordazas dado en mm (in.).

La relación del esfuerzo y la deformación generalmente inicia con un comportamiento elástico que se caracteriza por ser lineal y el material debe regresar a su longitud original cuando se libera el esfuerzo. Esta relación es definida por la ley de Hooke [21]

$$\sigma_e = Ee$$

Donde E es el módulo de elasticidad dado en MPa (lb/in².) esta es una constante de cada material que caracteriza su resistencia.

Las propiedades mecánicas de las arterias son importantes ya que determinan algunos aspectos de la función vascular. Existe un parámetro físico muy útil denominado la conformidad (C; compliance) ya que refleja la naturaleza elástica de la pared de los vasos y se define como la fracción de cambio del área de la sección transversal (A) por unidad de cambio en la presión (P) normalizada por la sección transversal media (A_0) [22].

$$C = \frac{\partial A / \partial P}{A_0}$$

Se conoce que es inversamente proporcional a la propagación de velocidad de onda (C_0) y ρ corresponde a la densidad del fluido.

$$C = \frac{1}{\rho C_o^2}$$

Los cambios en la conformidad de la arteria tiene un correlación directa con la edad y diversas cardiopatías como la hipertensión y la aterosclerosis [23]. Sin embargo con el fin de obtener una relación trazable entre la presión, conformidad, área del vaso en algunos modelos [24] los valores son constantes para un amplio rango de presiones. La conformidad de los tubos se puede predecir mediante una relación entre las propiedades elásticas y las características geométricas.

La razón a la que las ondas de velocidad y presión se propagan en un vaso elástico se determina de las propiedades de la pared y el fluido en este caso la sangre. La velocidad de propagación de las ondas esta dado por la ecuación de Moens-Korteweg en función de las características del vaso y el fluido.

$$C_o = \frac{1}{\sqrt{\rho \left(\frac{1}{\varepsilon} + \frac{2R}{Eh} \right)}} \cong \frac{1}{\sqrt{\frac{\rho 2R}{Eh}}}$$

Donde ε es el módulo de elasticidad del fluido, R es el radio interior del vaso, E (módulo de Young) es el módulo de elasticidad de la pared y h es el espesor de la pared. El valor de ε es comparativamente grande de tal forma que el término $1/\varepsilon$ se puede despreciar. Esta ecuación supone un tubo perfectamente elástico con un pequeño espesor de pared en comparación con el diámetro. La impedancia es una característica calculada de la ecuación de water hammer [25]. Esta propiedad no indica una relación entre el flujo y el cambio de presión.

$$Z_0 = \frac{\rho C_0}{\pi r^2}$$

2 METODOLOGIA

En esta sección se dará a conocer la forma de llevar a cabo el estudio desde la elaboración de los conductos y el plan para incurrir en el mínimo de errores y así mismo mantener cada experimento con el menor número de variables posible.

2.1 Elaboración de Conductos de Submucosa Intestinal (SIS)

La obtención de las membranas de submucosa intestinal porcina se llevo a cabo utilizando la metodología propuesta por Tabima D. [2], la cual se deriva de una metodología propuesta por Badylak y col. [26] con ciertos cambios de tal forma que se pueda adecuar al uso en la Universidad de Los Andes y a la planta piloto de hemosustitutos de la Fundación Cardioinfantil.

2.1.1 Materiales y Reactivos

El material primario utilizado es intestino delgado de porcino proveniente del Frigorífico Guadalupe S.A. Para la adecuación de este, se utiliza una solución de hipoclorito de sodio y peroxido de hidrógeno. Además es necesario contar con equipo básico quirúrgico, una espátula y recipientes para hacer los lavados.

Para la elaboración de los conductos una vez obtenidas las membranas, es necesario tener moldes de los diámetros y geometrías deseadas. Estos deben ser preferiblemente en acero inoxidable 316L ya que este es el especificado para uso clínico por su bajo contenido de carbono.

Para la extracción de los conductos se necesita una fibra polimérica o natural dependiendo del diámetro de los conductos.

Para la preparación de la heparina y para la reacción se requiere de pipetas, termorregulador, agitador y equipo de seguridad que incluya máscara para vapores orgánicos, guantes de nitrilo y gafas de seguridad. Las soluciones y reacciones se llevan a cabo bajo una campana de extracción. Se debe oxidar la heparina (heparina sódica liquidum *Braun Medical S.A., Jaén, España*) con periodato de sodio (Merck, Alemania) en buffer de fosfatos y luego hacerla reaccionar con submucosa intestinal porcina SIS, con cianobrohidruro de sodio (Merck, Alemania) en buffer de acetato. Para realizar lavados se usa NaCl.

Para la reacción de heparinización covalente se utilizan pipetas, micropipetas, material de vidrio y balanza electrónica analítica. Se estabilizan las

láminas de submucosa intestinal porcina (SIS), en buffer de MES (*Merck, Alemania*) y se preactiva la heparina (heparina sódica liquidum *Braun Medical S.A., Jaén, España*) con los mediadores N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, *Sigma Aldrich, USA*) y N-hidroxisuccinimida (NHS, *Merck, Alemania, Bogotá, Colombia*). Se llevan a cabo lavados con soluciones de NaHPO_4 y NaCl. El secado se realiza en una cámara de flujo laminar.

2.1.2 Procedimiento No. 1: Obtención de SIS.

- Obtener Intestino delgado de los animales recién sacrificados.
- Almacenar a 4 °C en solución salina.
- Retirar el mesenterio y se lava 5 veces hasta quede limpio.
- Abrir el Intestino Delgado en dirección longitudinal.
- Remover la capa muscular y serosa utilizando el raspador.
- Raspar una vez más la Submucosa Intestinal (SIS) para retirar cualquier tejido remanente indeseable.
- Sumergir en agua durante 2 horas hasta que desaparecen los residuos de sangre.
- Exponer a una mezcla de mezcla de 0.5% Hipoclorito de Sodio y 0.5% de Peróxido de hidrógeno por un periodo de 15 minutos con el objetivo de eliminar cualquier célula remanente.
- Lavar con PBS (Phosphate-Buffered Saline - pH=7), durante 15 minutos.
- Lavar con agua destilada.

2.1.3 Procedimiento No. 2: Elaboración de Conductos

- Recubrir el molde de acero inoxidable de 5 mm de diámetro utilizando la fibra, la distancia entre cada vuelta depende del diámetro del molde a utilizar haciendo necesario que sea mas continua a medida que este disminuye.
- Recubrir el molde enrollando las membranas de Submucosa Intestinal de 55mm x 55mm en dirección longitudinal paralelo al molde, con el fin de obtener 4 capas.
- Deshidratar los conductos en flujo laminar durante un periodo de 12 horas.

- Una vez estén totalmente deshidratados, retirar la fibra en sentido axial al conducto.
- Retirar el conducto del molde.
- De ser necesario esterilizar utilizando Oxido de Etileno (ETO).

*Para la elaboración de los conductos se mantuvieron las máximas condiciones de asepsia.

2.1.4 Procedimiento No. 3: Fijación de heparina

Este procedimiento se basa en el descrito por Keuren et Al [27] y a continuación se presenta con algunas modificaciones:

- Se oxida la heparina sódica en una solución de NaIO_4 (82 mg/mL) en buffer de fosfatos 0.05M a un pH 6.5-6.8 durante 12 horas bajo incubación a 37°C.
- Se diluye la solución anterior en buffer de acetato 0.2M (pH=4.66) a una relación de 1 a 5 y se adicionan 0.2mg NaCNBH_3 /mL de buffer de acetato.
- Se incuban las láminas de colágeno (SIS) en 20mL de la anterior solución a 37°C bajo agitación constante por 12 horas.
- Se extrae la lámina de la solución y se procede a lavarla 5 veces durante 10 minutos con agua desionizada para que la heparina que no se haya ligado salga.
- Se hace un lavado con una solución 4M de NaCl por 24 horas.

Este procedimiento se basa en el descrito por Pieper et Al [28] y a continuación se presentan con algunas modificaciones:

- Se equilibra una lámina de SIS durante 30 minutos en buffer-MES 0.05M a pH 5.6 a una razón de 0.4mL /mg SIS.
- Se activan los grupos carboxílicos de la heparina con EDC y NHS en una solución 2% (p/V) de heparina en buffer MES 0.05M a pH 5.6, bajo una relación molar EDC: NHS: Heparina 2.4:0.56:1.0 y a una razón molar heparina-COOH: SIS-NH₃ de 2.4:1.
- Pasados 10 minutos se agrega la lámina y diluye hasta un volumen de 188.3mL/g de SIS y se deja reaccionar por 2 horas.

- Se retira la lámina de SIS y se lava con fosfato ácido de sodio 0.1M durante 2 horas.
- Se llevan a cabo cuatro lavados adicionales con NaCl 4M por 24 horas cada uno.
- Se hacen tres lavados con agua destilada por 24 horas cada uno.
- Se seca la lámina resultante en una cabina de flujo laminar durante 30 minutos.

2.2 Caracterización de Conductos

Con el fin de determinar las propiedades del material y así mismo diferenciarlo una vez explantado, es necesario hacer una caracterización que incluya parte de las pruebas con las cuales se va a evaluar el desempeño en el tiempo del conducto.

2.2.1 Pruebas Mecánicas

En la caracterización mecánica de los conductos se utilizan los mismos tubos que se implantan y se les hace un corte longitudinal de tal forma que se practican las pruebas de tensión en láminas rectangulares de 55 mm x 73 mm x 0,167 mm, la distancia entre mordazas es 20 mm y se hacen a una velocidad de 10mm/min. Se realizan distintas pruebas con la SIS deshidrata y previamente hidratada para el momento del ensayo y con los datos de la prueba se construye la curva esfuerzo contra deformación y así se obtiene el módulo de Elasticidad (E) de la pendiente de la parte inicial que conserve un comportamiento lineal, el esfuerzo último (δ_u) y la deformación máxima de las muestras.

2.2.2 Pruebas Histopatológicas

En la caracterización histológica de los conductos se utilizan los conductos que se implantan, los cortes histológicos se realizan en la Fundación Cardioinfantil en el departamento de patología. Para esto se utiliza un procesador automático de tejidos, se pasa la muestra a parafina y se hacen cortes de 2 – 3 μ m en un micrótopo de rotación. Para hacer las tinciones es necesario desparafinar la muestra, realizado este proceso se utiliza hematoxilina-eosina.

Con estos métodos se evalúa la calidad de los conductos y su apariencia inicial ya que de esta forma es mas fácil contrastar los cambios en el tiempo una vez explantados.

2.3 Modelo In Vivo

La implementación del modelo in vivo se hará con un grupo de 12 bovinos neonatos (entre 3 y 6 días de nacidos), divididos en tres grupos cada uno de 6 animales así:

Grupo 1: 6 bovinos a los cuales se les implantará un conducto vascular de SIS, previa heparinización del mismo.

Grupo 2: 6 bovinos a los cuales se les implantará un conducto vascular de SIS, sin previa heparinización del mismo.

El protocolo del modelo animal es el siguiente:

El procedimiento se llevará a cabo en la sala de cirugía experimental de la FCI IC.

- Anestesia:

Se utilizará un anestésico de corta duración (Ketamina) asociado a un relajante muscular (Xylazine) de la siguiente forma

Profundidad y tiempo quirúrgico	Agente	Dosis	Agente	Dosis
Quirúrgica 20 – 30 minutos	Ketamina	5 mg/kg	Xylazine	0,2 mg/kg

-Implantación de los injertos vasculares:

1. Antibiótico profiláctico (Cefalotina 15mg/kg IM).
2. Rasurar del sitio quirúrgico.
3. Incisión cervical anterior.
4. Identificar de la arteria carótida.
5. Heparinizar vía intravenosa (200 IU/kg) previo a la colocación del clamp.
6. Colocar clamps vasculares.

7. Anastomosis término-terminal utilizando conducto vascular (colágeno/PTFE) a la arteria carótida proximal con sutura de nylon (Ethicon) 7-0. No absorbible.
8. Restablecer el flujo sanguíneo.

El sacrificio se realizará bajo el siguiente cronograma:

Grupo No. 1 SIS hep.	Grupo No. 2 SIS No-hep.	Fecha del sacrificio
2	2	45 días después del injerto
2	2	90 días después del injerto
2	2	180 días después del injerto

Los animales se mantienen en clínica veterinaria de la Universidad de La Salle.

Para la toma de la muestra (para el análisis mecánico e histopatológico) se seguirá el siguiente procedimiento:

1. Anestesia (según el procedimiento para la implantación de injertos).
2. Rasurar el sitio quirúrgico.
3. Incisión, disección e identificación de la arteria carótida y conducto vascular.
4. Sección en carótida proximal y distal.
5. Extracción del injerto.
6. Almacenamiento de muestras en formol.
7. Envío de muestras a patología.
8. Colocar de pentotal sódico (100 mg/kg) endovenoso.

2.4 Evaluación del Desempeño (no invasivo)

La evaluación del desempeño por métodos no invasivos es indispensable para la investigación ya que se puede obtener información adicional del progreso y se garantiza que el conducto continúe permeable hasta la fecha.

A cada uno de los animales se les practicará una evaluación ecográfica (Doppler vascular) el día de la implantación y se le hace un seguimiento post-

implantación del conducto cada 15 días y una ecografía el día del retiro del injerto.

2.5 Evaluación del Desempeño (invasivo)

Con la finalidad de corroborar algunos valores teóricos obtenidos por métodos no invasivos es necesario obtener los valores experimentales y ver microscópicamente que esta ocurriendo en el soporte.

2.5.1 Pruebas Mecánicas

Se realizan pruebas de tensión al injerto y a la carótida proximal y distal, estas pruebas se realizan en el Centro de Innovación y desarrollo Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CITEC). Con estas pruebas se obtienen las curvas del Esfuerzo (δ) vs. Deformación (ϵ) y Carga (L) vs. Deformación (ϵ) para los tejidos. Estas pruebas nos permiten calcular el modulo de Young (E) y el esfuerzo último (δ_u) de forma experimental.

Así mismo se obtienen los datos necesarios para calcular experimentalmente la velocidad de propagación de onda y la impedancia. Con estos valores se construye una gráfica que muestre la evolución del acople entre la arteria nativa y el conducto vascular.

2.5.2 Pruebas Histopatológicas

En la caracterización histológica de los conductos se utilizan los conductos que se implantan, los cortes histológicos se realizan en la Fundación Cardioinfantil en el departamento de patología. Para esto se utiliza un procesador automático de tejidos, se pasa la muestra a parafina y se hacen cortes de 2 – 3 μm en un micrótopo de rotación. Para hacer las tinciones es necesario desparafinar la muestra, realizado este proceso se utiliza hematoxilina-eosina y tricrómico elástica además los segmentos también serán teñidos con anticuerpos monoclonales CD 31 para cuantificación de células endoteliales y RAM-11 para macrófagos (DAKO® Corporation, CA), con el fin de determinar la cobertura endotelial, la neovascularización de la placa y la infiltración de macrófagos. Un análisis individual de los segmentos será hecho utilizando un microscopio de luz

(Olympus BX50). Los segmentos serán medidos usando morfometría digital y planimetría computarizada (Media Cybernetics ® Image-Pro Plus TM).

3 RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos utilizando las metodologías descritas anteriormente. Entre estos se encuentran características de conductos de SIS de 2 y 4 capas, pruebas histopatológicas de los conductos tal como son una vez finalizada su fabricación y explantados. Mediante modelos hemodinámicos y con la caracterización mecánica de los conductos explantados se hicieron predicciones del flujo a lo largo del tiempo.

3.1 *Elaboración de Conductos*

Se elaboraron conductos de SIS de 2 y 4 capas, los conductos de 2 capas siguen la orientación longitudinal de intestino mientras que para los de 4 capas se hicieron 3 configuraciones distintas longitudinales, transversales y diagonales (0, 45 y 90°). A simple vista los conductos se pueden diferenciar entre los de 2 y 4

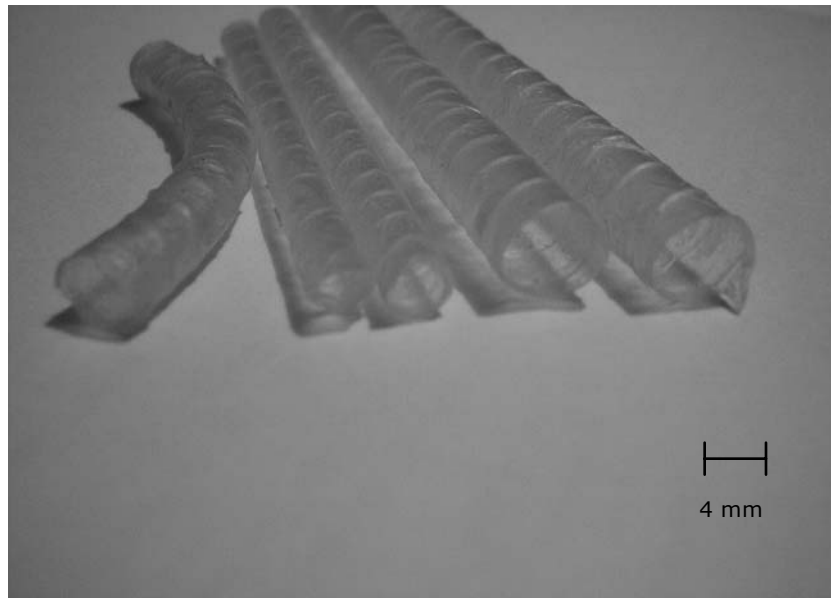


Figura 2. Conductos de Submucosa Intestinal en su forma deshidratada.

capas pero es muy difícil poder distinguir cual de estos tiene una orientación de las fibras en particular. En la figura 2, se observan conductos de distintos diámetros y geometrías que se fabrican con la metodología mencionada.

3.2 Caracterización de Conductos Vasculares

3.2.1 Pruebas Mecánicas

En esta sección se muestran las pruebas mecánicas de los conductos de SIS, de 4 y 2 capas respectivamente. Estas incluyen la curva esfuerzo - deformación en su forma deshidratada e hidratada, el módulo de elasticidad aproximado mediante una regresión lineal donde la constante que acompaña a la variable representa este valor con su respectivo factor de correlación (r^2). Incluye el esfuerzo último promedio y la deformación máxima promedio para cada una de las orientaciones con su respectiva desviación estándar.

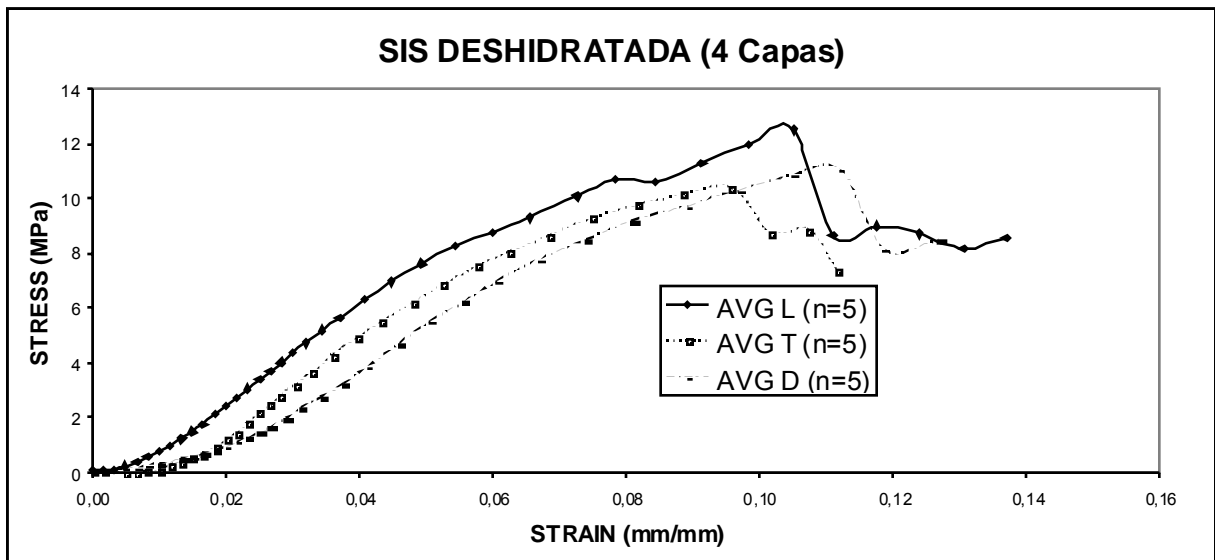


Figura 3. Curva esfuerzo - deformación promedio en conductos de 4 capas de SIS deshidratada para 3 distintas orientaciones.

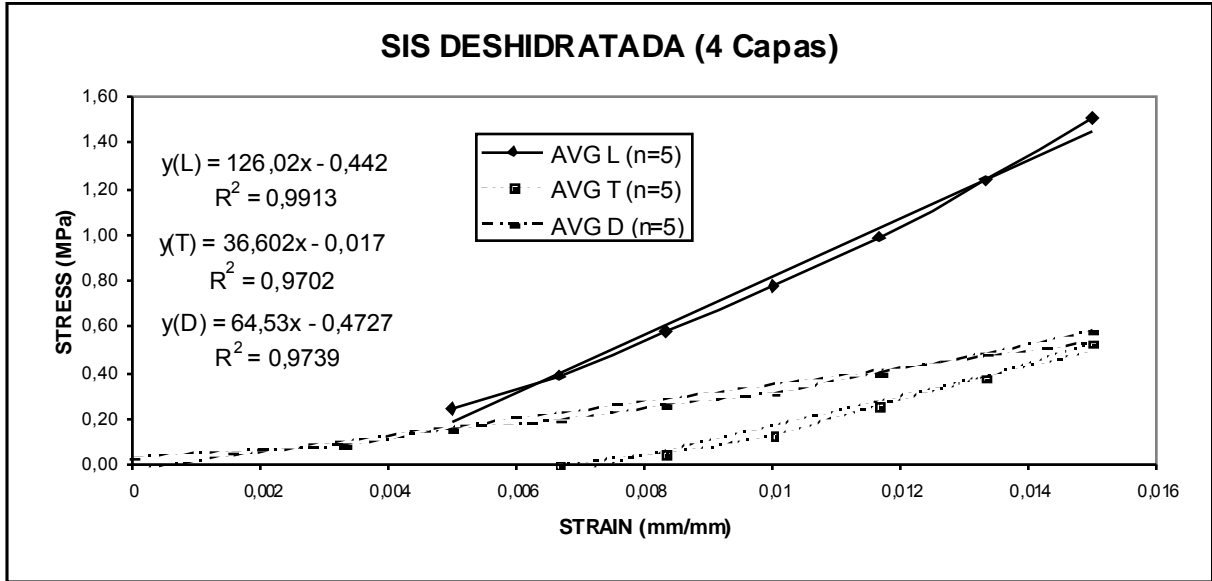


Figura 4. Aproximación del módulo de elasticidad en la región inicial en conductos de 4 capas de SIS deshidratada para 3 distintas orientaciones.

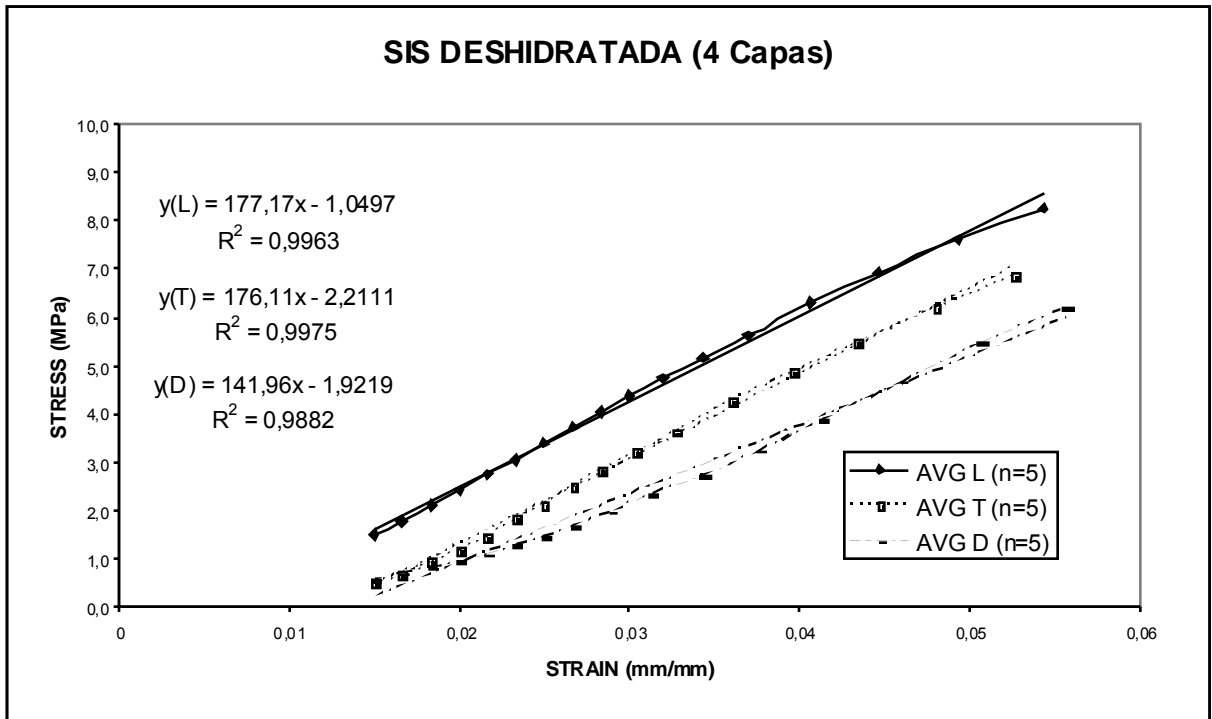


Figura 5. Aproximación del módulo de elasticidad en la segunda pendiente.

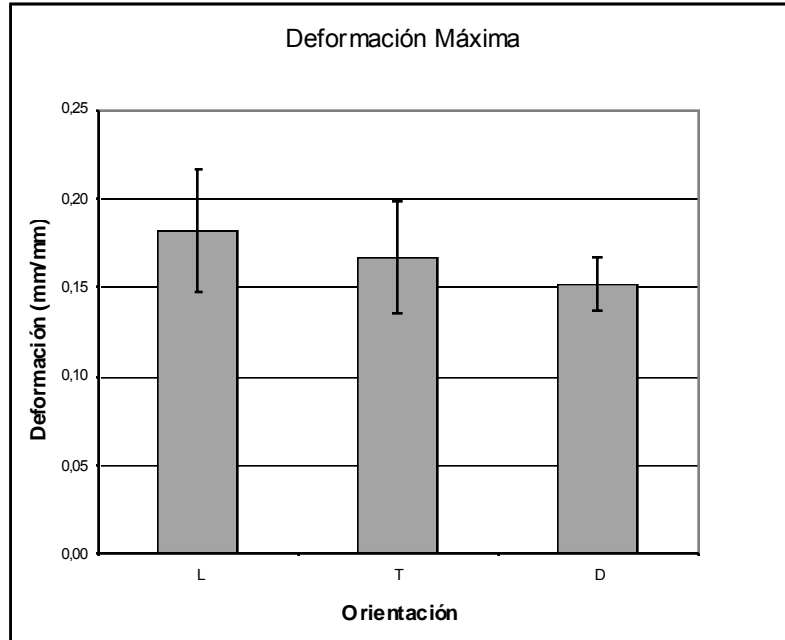


Figura 6. Deformación máxima promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS deshidratados para 3 distintas orientaciones.

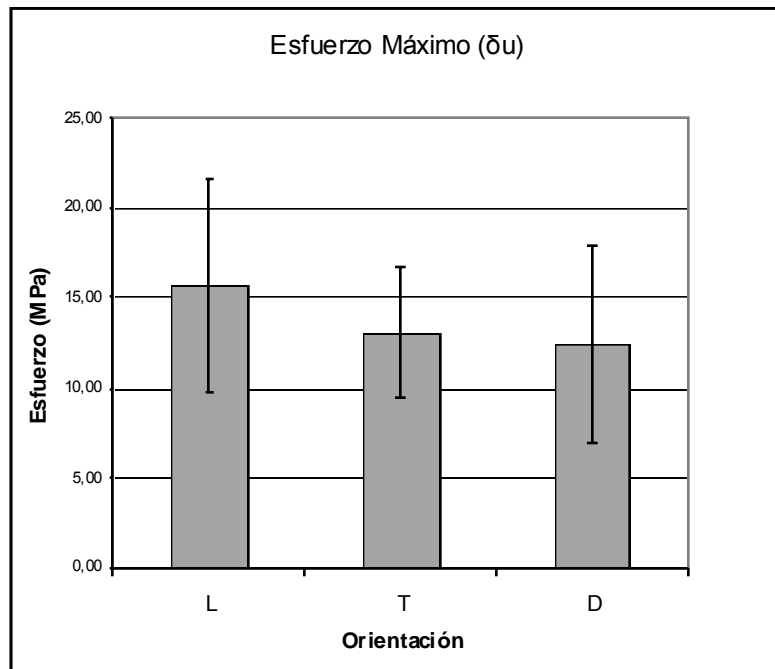


Figura 7. Esfuerzo último promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS previamente hidratados para 3 distintas orientaciones.

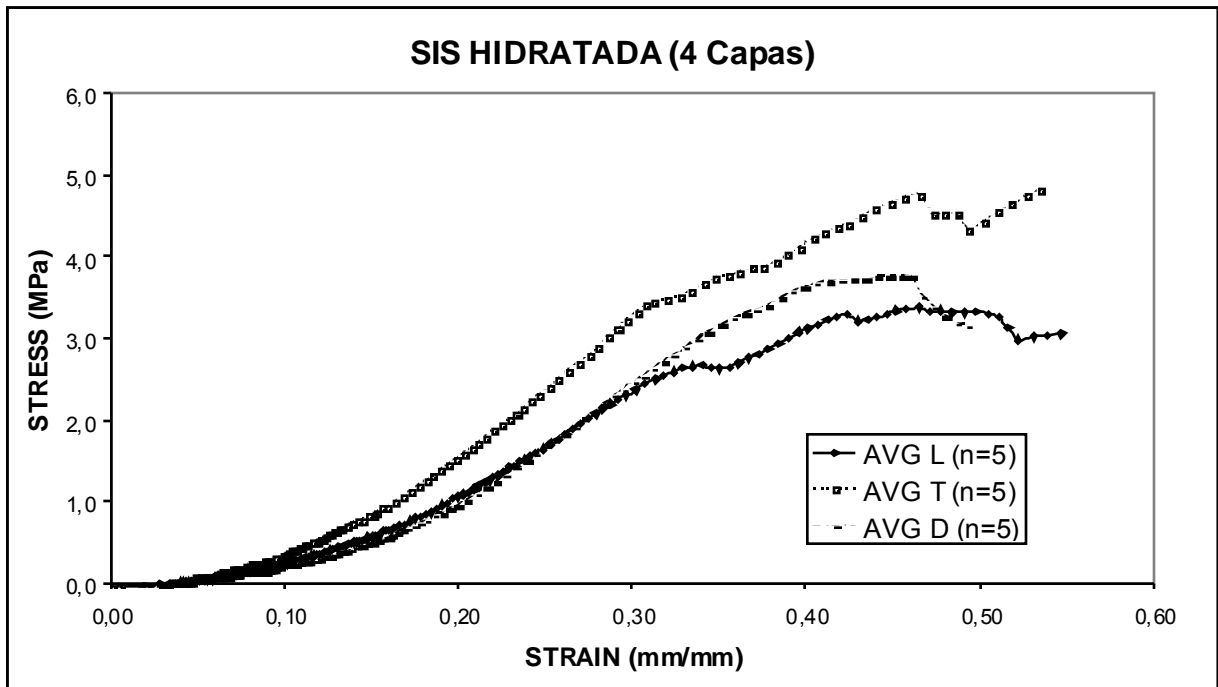


Figura 8. Curva esfuerzo – deformación en conductos de SIS de 4 capas previamente hidratados.

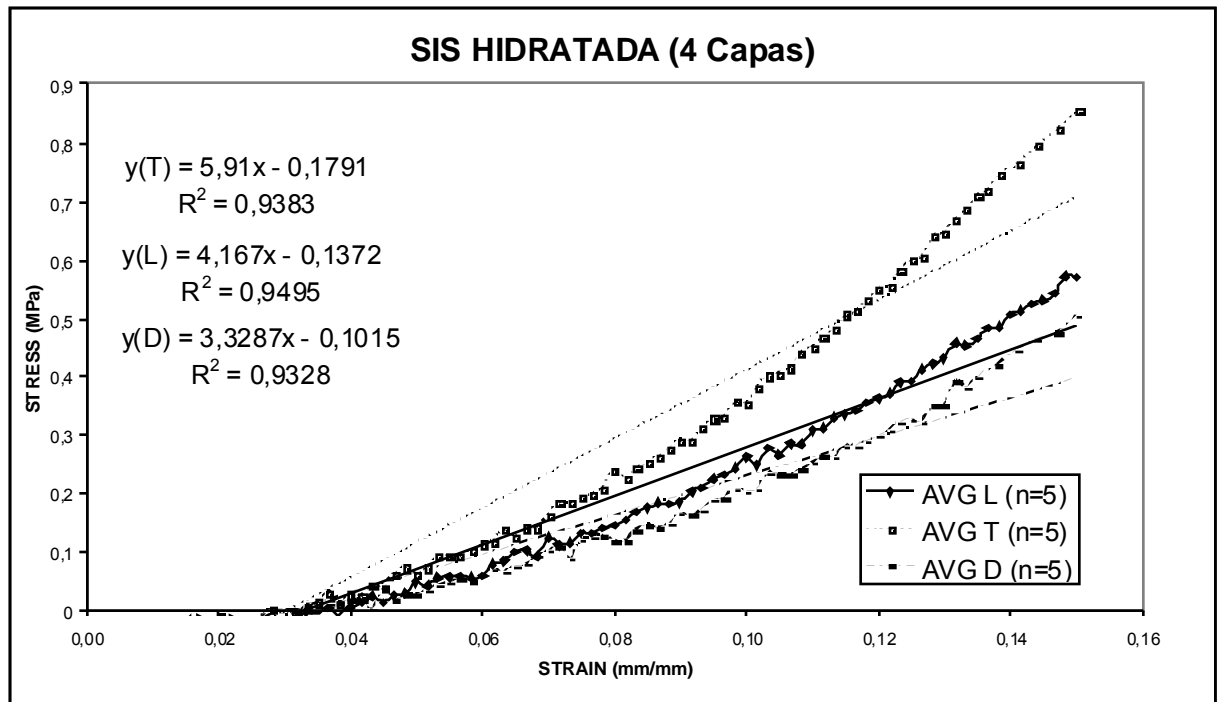


Figura 9. Aproximación del módulo de elasticidad en la región inicial en conductos de 4 capas de SIS deshidratada para 3 distintas orientaciones.

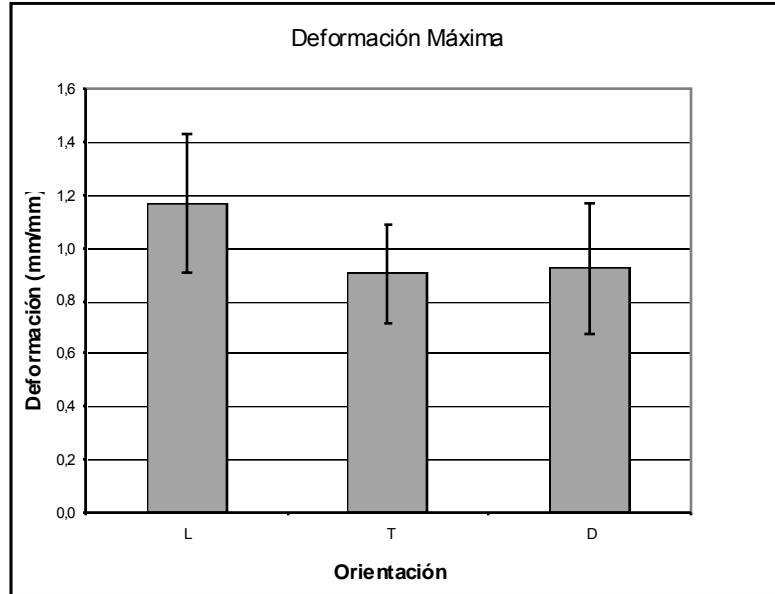


Figura 10. Deformación máxima promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS previamente hidratados para 3 distintas orientaciones.

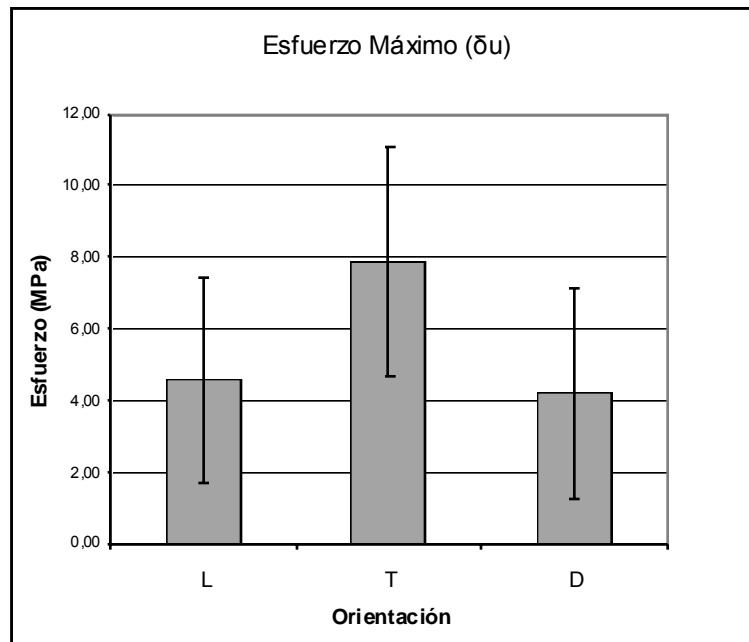


Figura 11. Esfuerzo último promedio y desviación estándar en conductos de 4 capas de SIS previamente hidratados para 3 distintas orientaciones.

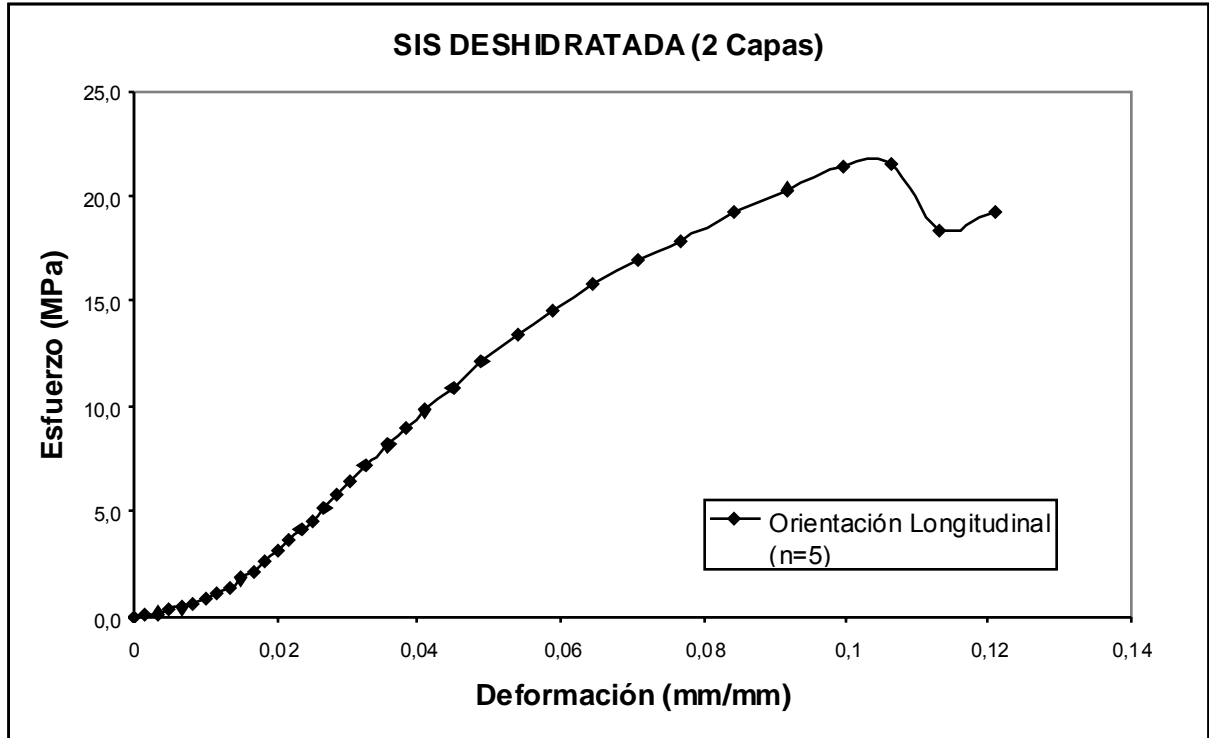


Figura 12. Curva esfuerzo - deformación en conductos de SIS de 2 capas deshidratados.

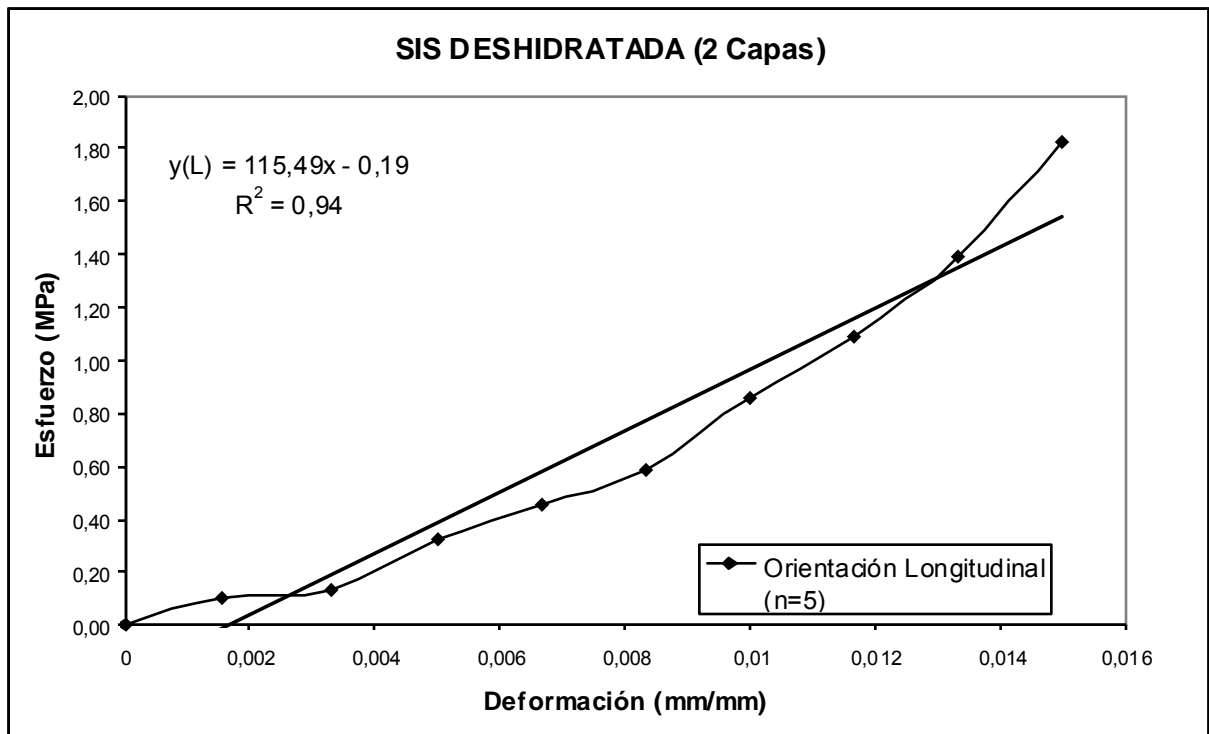


Figura 13. Aproximación del módulo de elasticidad en conductos de SIS de 2 capas deshidratados.

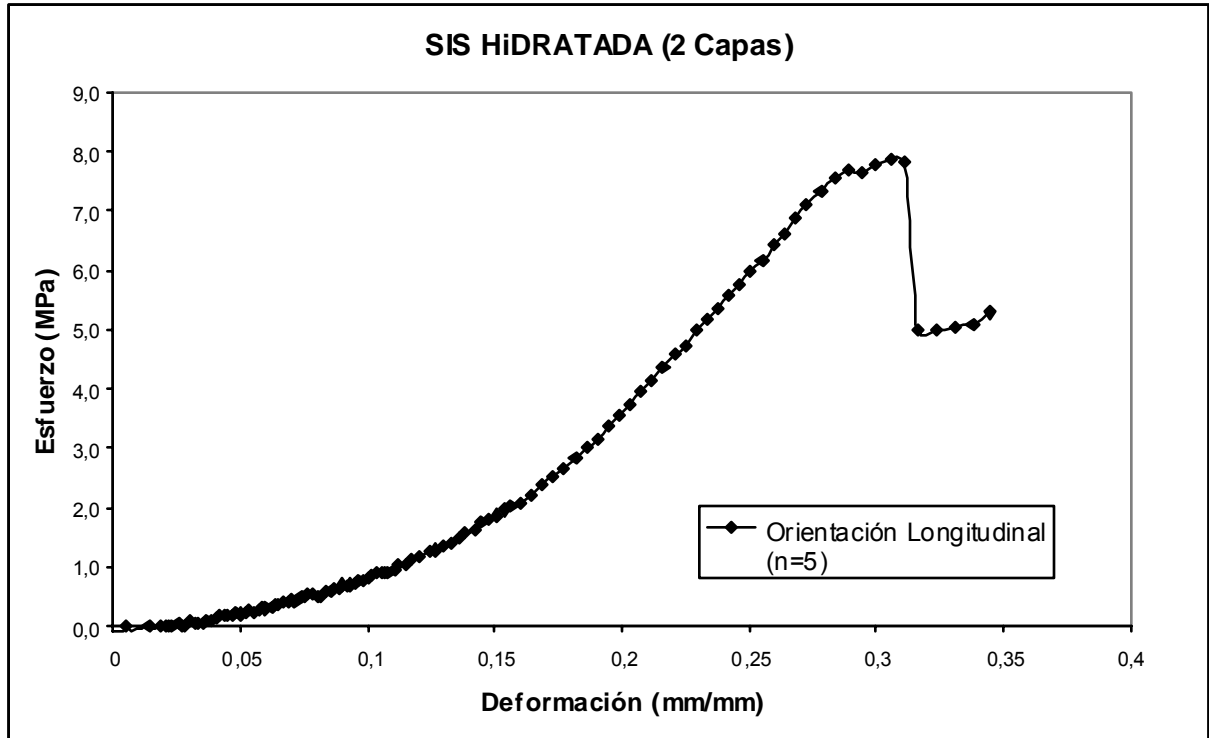


Figura 14. Curva esfuerzo - deformación en conductos de SIS de 2 capas previamente hidratados.

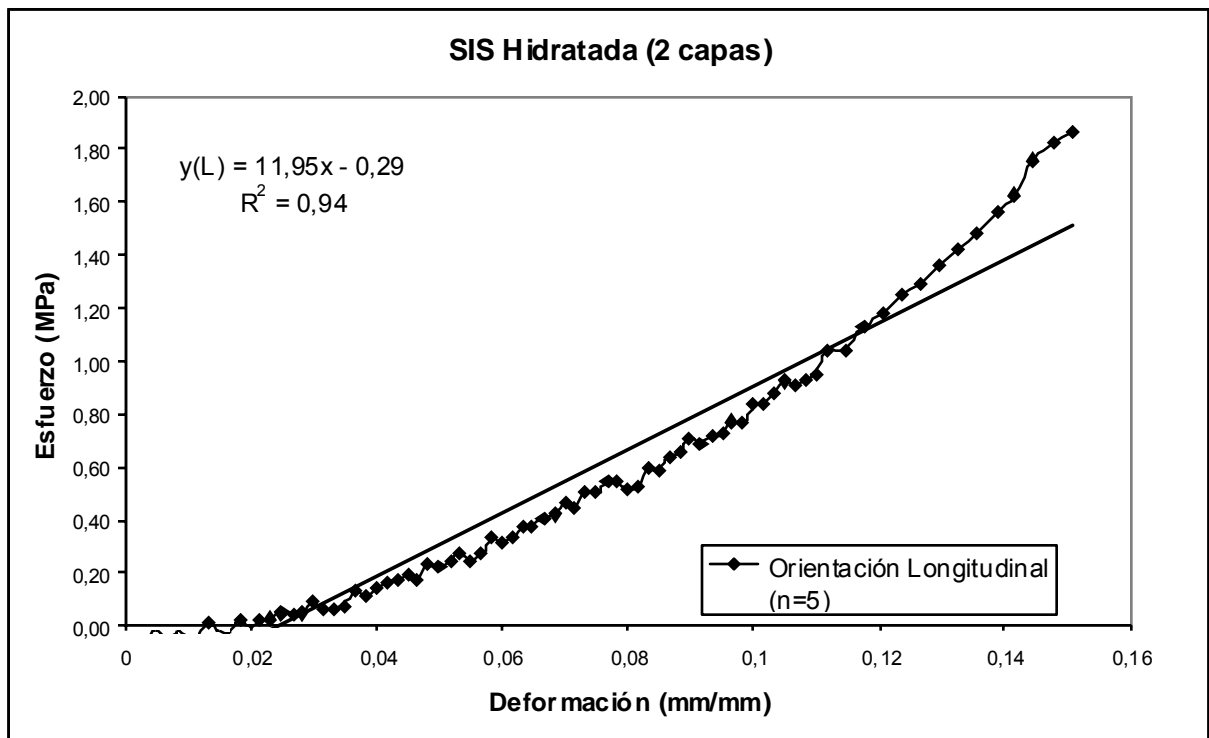


Figura 15. Aproximación del módulo de elasticidad en conductos de SIS de 2 capas previamente hidratados.

CONDUCTO	ϵ max. (mm/mm)	ϵ (mm/mm)	E (MPa)	r^2	δ_u (MPa)	n
4LD	0,18±0,03	0-0,016	126,02	0,99	15,69±5,94	5
2LD	0,18±0,04	0-0,016	115,49	0,94	26,79±6,98	5
4LH	1,17±0,26	0-0,16	4,16	0,95	4,55±2,86	5
2LH	0,82±0,20	0-0,16	11,95	0,94	11,13±4,94	5
4TD	0,17±0,03	0-0,016	64,53	0,97	13,03±3,67	5
4TH	0,90±0,19	0-0,16	5,90	0,94	7,84±3,20	5
4DD	0,15±0,01	0-0,016	36,60	0,97	12,42±5,55	5
4DH	0,92±0,25	0-0,16	3,32	0,93	4,19±2,92	5

Tabla 1. Resultados de las pruebas mecánicas en conductos de SIS de 2 y 4 capas, hidratados y deshidratados.

3.2.2 Pruebas Histopatológicas

La prueba de hematoxilina – eosina demostró que los conductos no tienen células viables, es indispensable que los conductos no tengan células remanentes de tal forma que se minimice la respuesta a un cuerpo extraño por parte del hospedero.

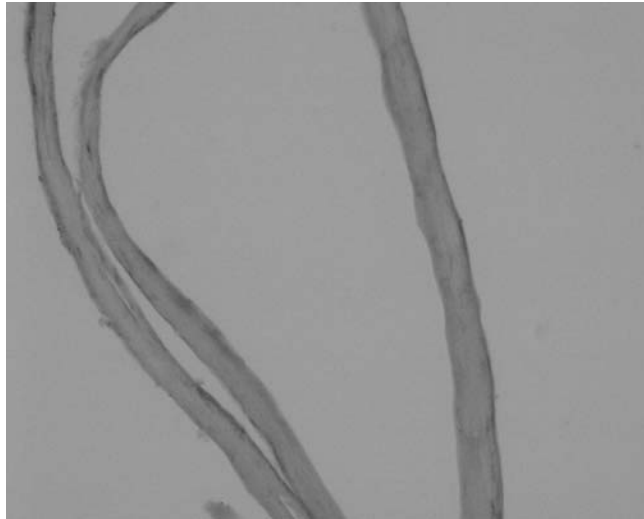


Figura 16. Tinción de Hematoxilina – Eosina en conducto de SIS después de su fabricación.

3.3 Evaluación del Desempeño (no invasivo)

Con el fin de tener la certeza que el conducto permaneciera permeable se practicaban esporádicamente un ECO Doppler, aquí se obtenía datos de la velocidad del flujo en la arteria distal, proximal y en el injerto. También se obtenían los diámetros y espesores de pared. Mediante este examen se podía ver si había un flujo turbulento en la sección del injerto, a continuación en la figura se muestra la velocidad de flujo en el injerto.

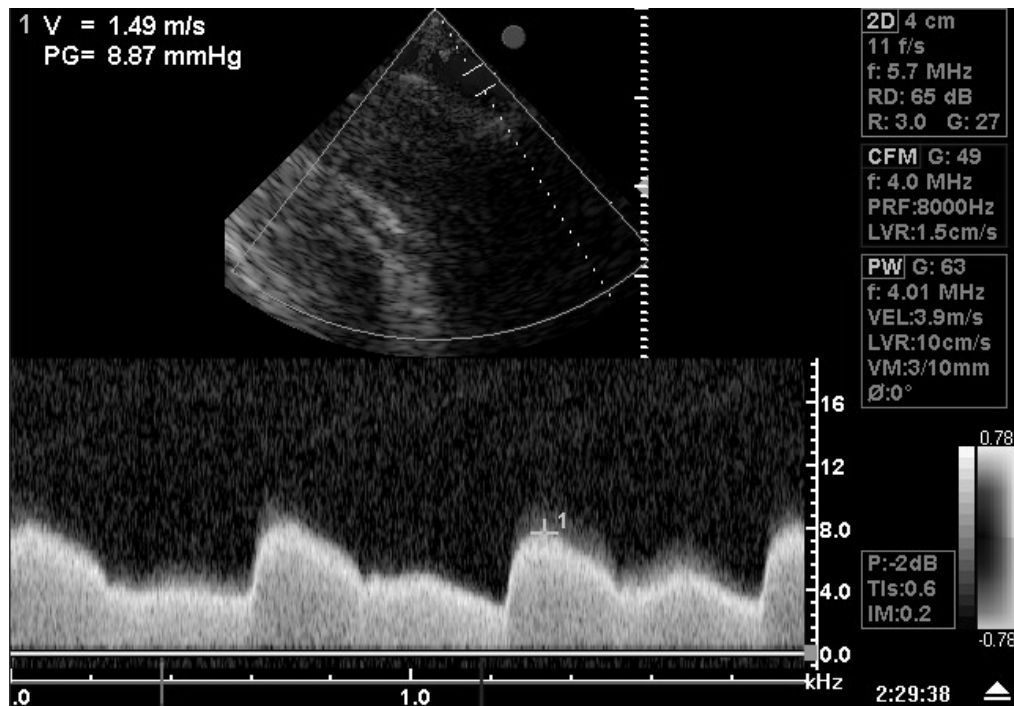


Figura 17. ECO practicado a los 45 días de implantación del dispositivo

3.4 Evaluación del Desempeño (invasivo)

Esta evaluación corresponde al modelo animal, proporciona una información precisa de las características de los diferentes tejidos lastimosamente limitan el seguimiento del sujeto. A continuación se muestran los datos de tensión en los que se estima el módulo de elasticidad de la forma mencionada anteriormente y las pruebas de patología de los tejidos para el caso de 180 días. Además se hace el cálculo de algunas de las propiedades de la pared arterial y del

flujo como lo es la distensibilidad, impedancia y la velocidad de onda respectivamente.

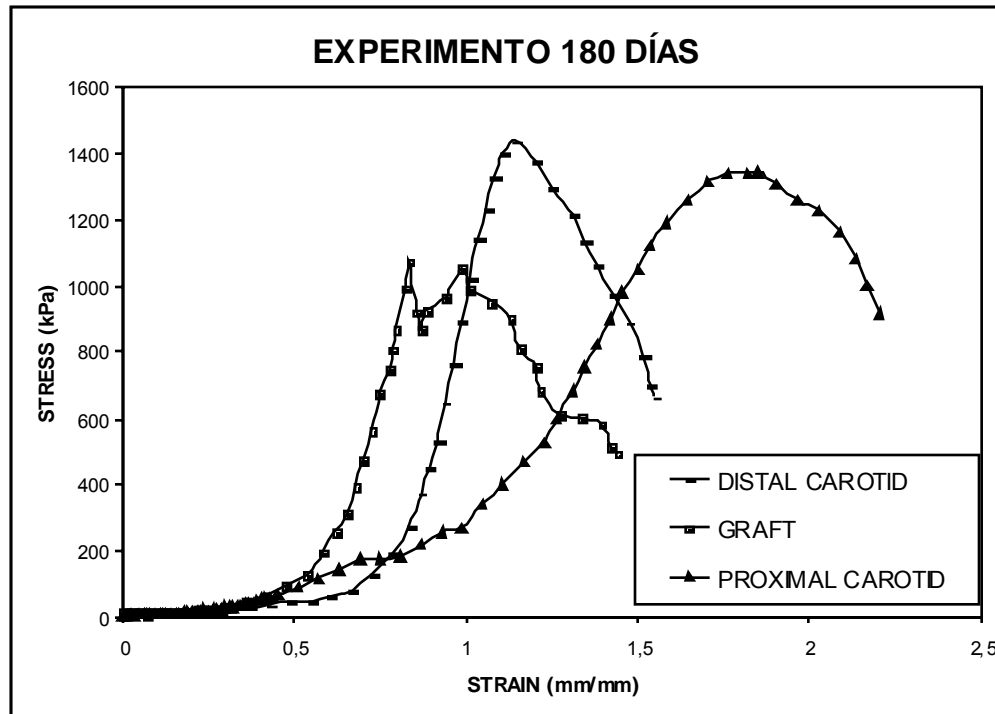


Figura 18. Curva esfuerzo - deformación de la carótida distal, proximal y el injerto explantado a los 180 días.

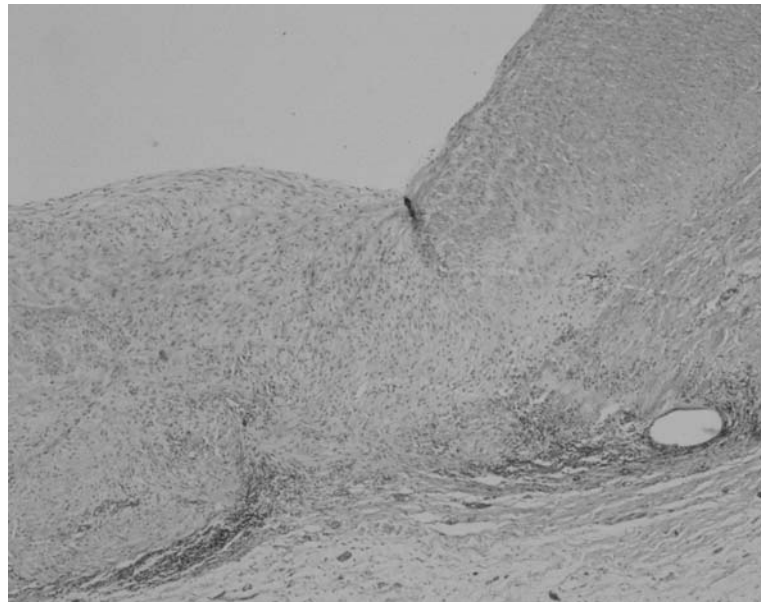


Figura 19. Tinción con Hematoxilina y Eosina en la frontera de la anastomosis. El injerto es el de la izquierda y se aprecia la menor densidad celular.

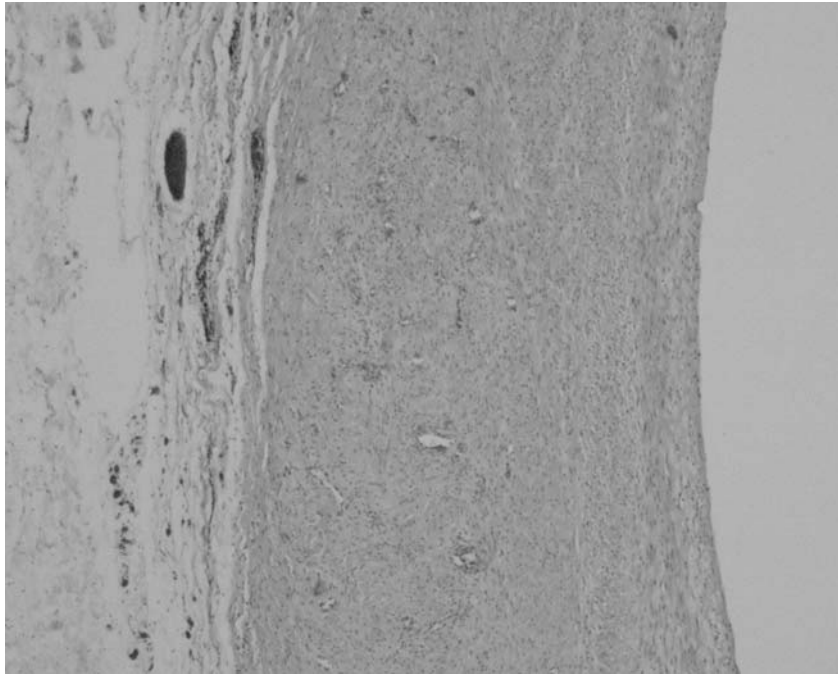


Figura 20. Tinción con Hematoxilina y Eosina en el injerto se aprecian las 3 capas íntima, media y adventicia desde las izquierda hacia la derecha.



Figura 21. Tinción tricrómico elástica donde se ve la orientación de las fibras longitudinales y transversales.

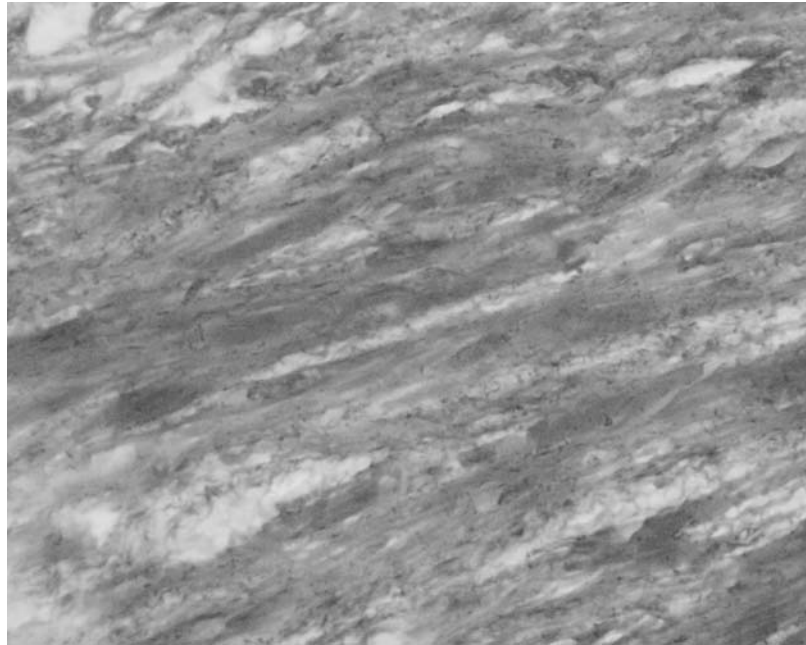


Figura 22. Tinción tricrómico elástica donde se ven las fibras de músculo liso.

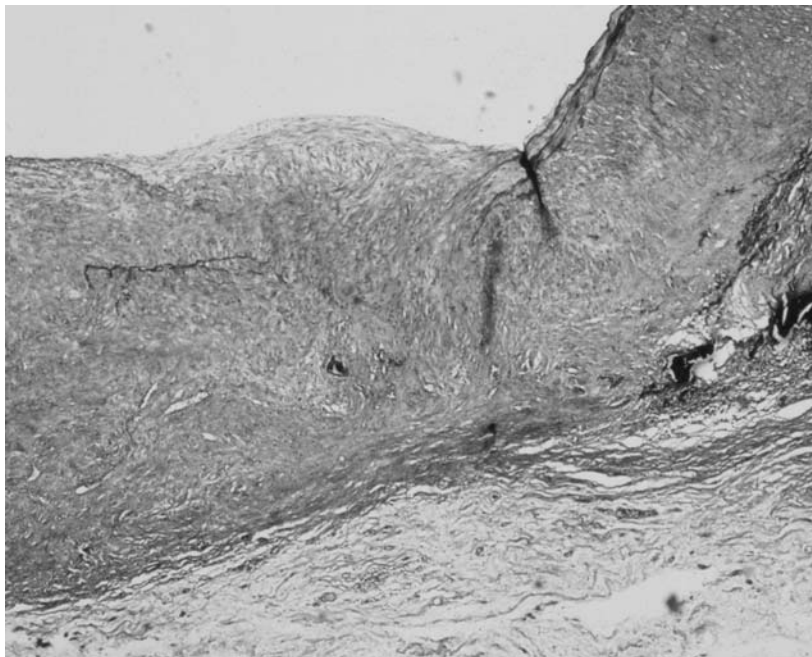


Figura 23. Tinción tricrómico elástica en la frontera de la anastomosis.

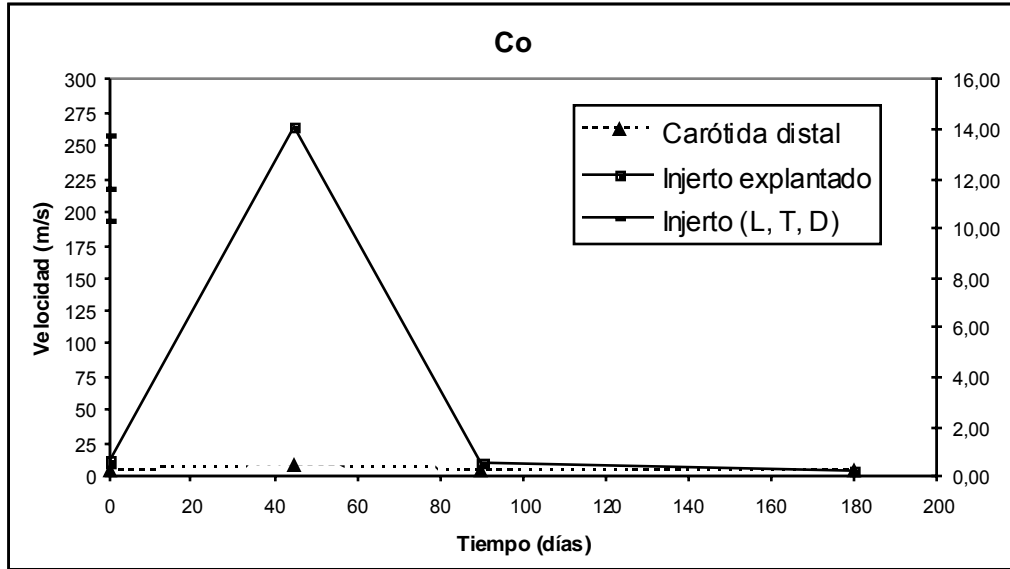


Figura 24. Comportamiento de la velocidad de onda (C_o) obtenida con el módulo de elasticidad de los injertos y las carótidas distales explantadas. La escala derecha es el indicador de velocidad para los injertos antes de implantar.

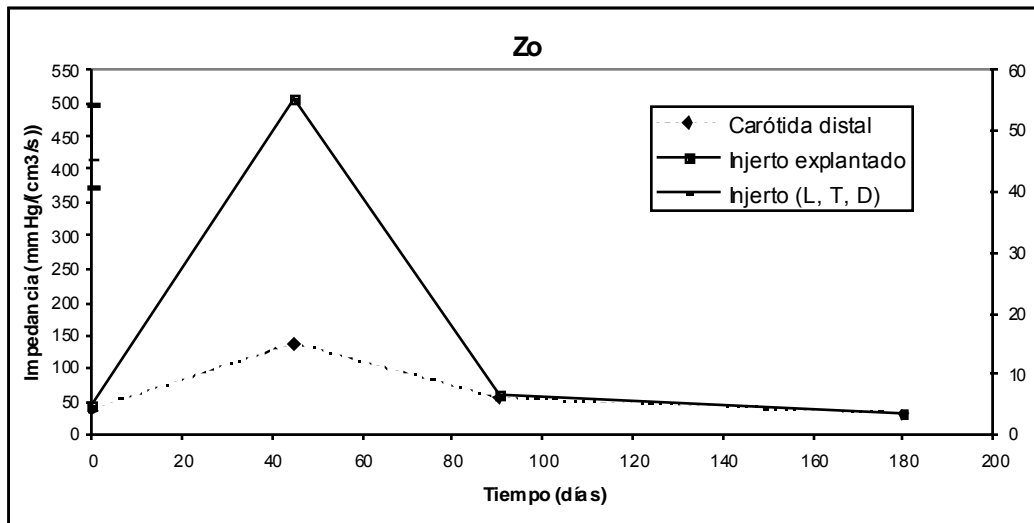


Figura 25. Comportamiento de la impedancia (Z_o) obtenida con el las velocidades de onda (C_o) de los injertos y las carótidas distales explantadas. La escala derecha es el indicador para los injertos antes de implantar.

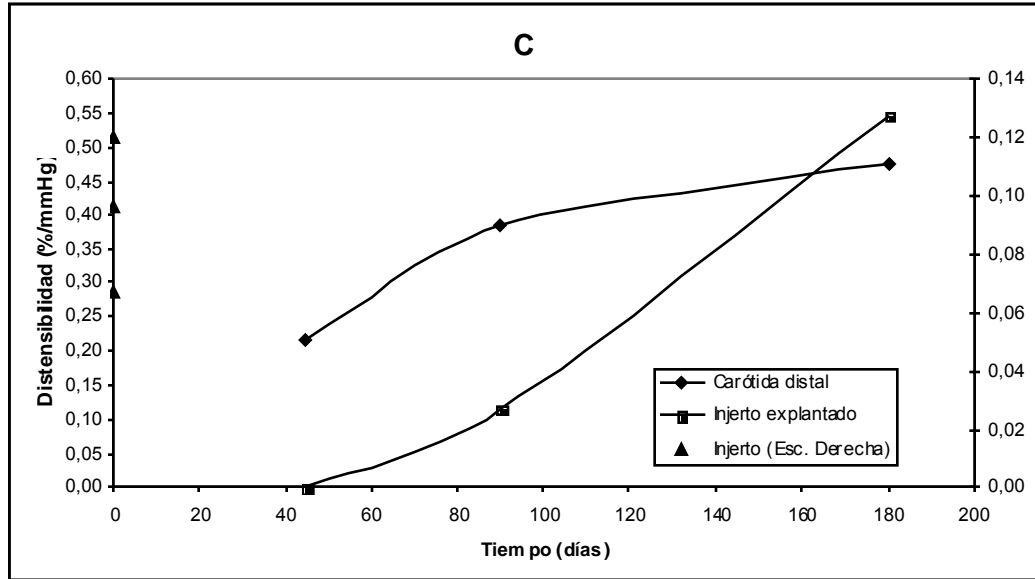


Figura 26. Comportamiento de la distensibilidad (C) obtenida con las velocidades de onda (C_0) de los injertos y las carótidas distales explantadas. La escala derecha es el indicador de para los injertos antes de implantar.

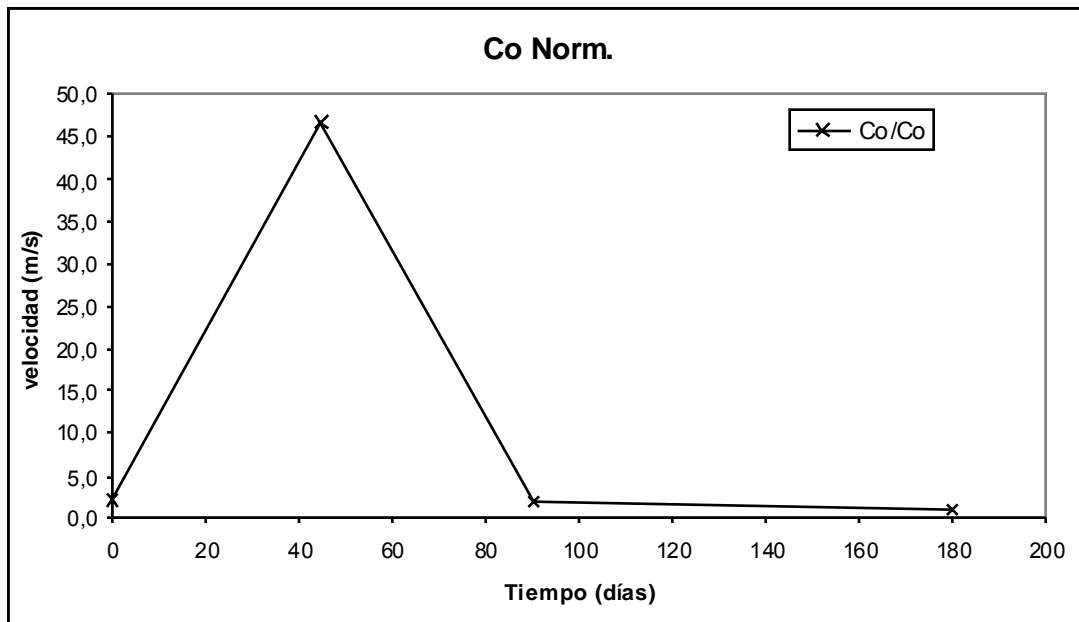


Figura 27. Comportamiento de la velocidad normalizada (C_0/C_0) esta gráfica indica cuantas veces es mayor la velocidad del flujo en el injerto en comparación con la arteria.

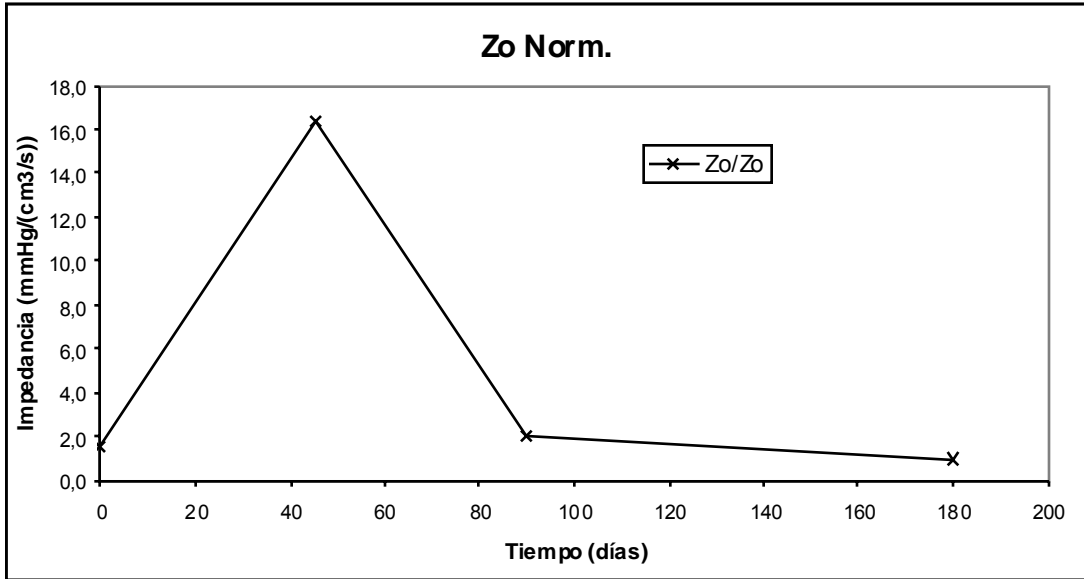


Figura 28. Comportamiento de la impedancia normalizada (Z_o/Z_o) esta gráfica indica cuantas veces es mayor la resistencia del flujo en el injerto en comparación con la arteria.

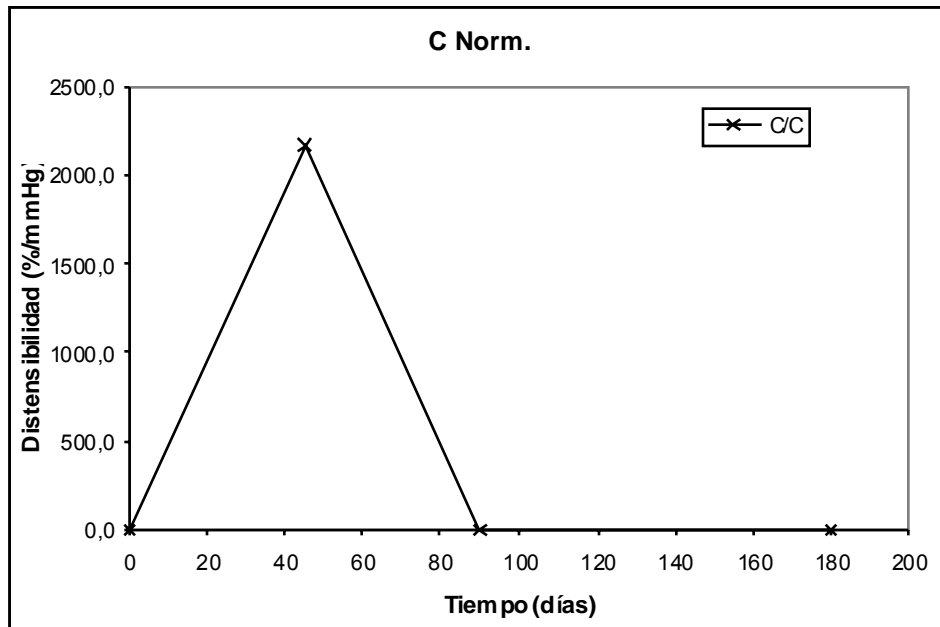


Figura 29. Comportamiento de la distensibilidad normalizada (C/C) esta gráfica indica cuantas veces es mayor la elasticidad de la arteria en comparación con el injerto.

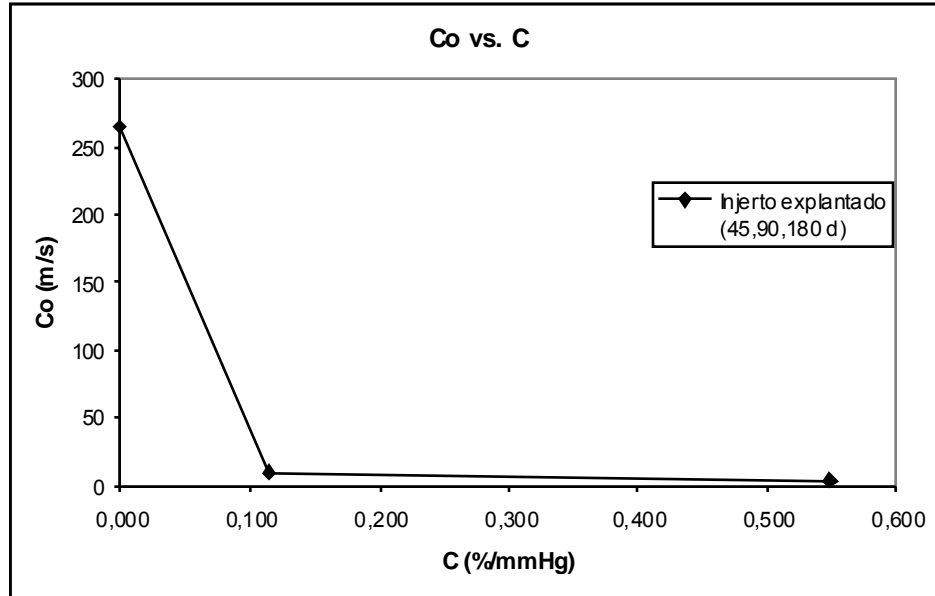


Figura 30. Comportamiento del cambio de la distensibilidad (C) con el cambio de la velocidad de onda (Co) en los injertos explantados.

3.5 Modelo In Vivo

Para realizar este protocolo se consultaron protocolos de experimentos similares con médicos y veterinarios con conocimientos en el área. Se estudió la patología del animal escogido y se consultaron las dosis necesarias para llevar a cabo el experimento. El modelo en bovinos resulta funcionar muy bien debido a que reúne las características necesarias para poner a prueba los conductos, ya que los diámetros a reemplazar oscilan entre 5 mm y el modelo animal permite la variación del diámetro de la arteria ya que se trata de un animal en crecimiento. Los animales son muy resistentes y dóciles lo que permite trabajar con ellos fácilmente y administrarles los medicamentos necesarios en todo momento y sin mayor dificultad. Sin embargo el modelo tiene algunas complicaciones como lo es la logística para el seguimiento de los animales, el transporte desde la clínica veterinaria de la Salle hasta la Fundación Cardioinfantil resulta complicado y requiere de varias personas, también se trata de animales costosos y con altas exigencias para su mantenimiento.

4 ANALISIS DE RESULTADOS

En el análisis de resultados se conserva el orden coherente de la tabla de contenido así que se mencionarán la elaboración de los conductos vasculares, su caracterización, del modelo animal y por último de los resultados del modelo.

4.1 Elaboración de Conductos Vasculares

4.1.1 Membranas de Submucosa Intestinal (SIS)

La metodología para la fabricación de membranas tiene muchas ventajas entre las cuales se encuentran los reactivos y los materiales que son de bajo costo, y por tratarse de un proceso manual depende de un operario que disminuye los costos. Desafortunadamente para hacer grandes cantidades la metodología resulta larga lo que puede causar descuidos por parte del operario, por otro lado no hay una medida directa para corroborar que el trabajo ha quedado bien hecho.

Es conveniente hacer más rigurosa la metodología de tal forma que se lograra obtener un espesor de membrana determinado, de la misma forma poder aprovechar la longitud del intestino delgado y ancho su máximo sin tanto desperdicio porque se rompa. De la misma forma un sistema de rodillos acompañado de un sistema "doctor blade" puede facilitar muchos pasos y homogenizar las propiedades de las membranas.

4.1.2 Conductos de Submucosa Intestinal (SIS)

La fabricación de los conductos es sencilla pero la metodología sigue siendo artesanal, es difícil que quede perfectamente recta la membrana sobre el molde al inicio de la fabricación del conducto ya que ésta se resbala continuamente, así mismo es difícil aplicar la misma tensión y aun más que no quede aire entre las capas de SIS.

Cuando se hicieron los primeros acercamientos para la obtención de conductos de SIS, se pensó en sobreponer el número de capas que se quería tener y dejar un porcentaje de la longitud total para su traslape, pero al tratarse de un material en su estado hidratado sumamente viscoso, se dificultaba esta

tarea y no se obtenían muy buenos resultados. Por esta razón sigue siendo una alternativa sobreponer capas deshidratadas e hidratarlas una sobre otra con el fin eliminar pliegues de la membrana pero resta determinar como se uniría la estructura tubular.

Por esta razón se prefirió que todo el conducto quedara traslapado, cortando la cantidad necesaria de membranas para un número dado de capas dependiendo del radio del molde.

El último cambio que se realizó en el proceso de fabricación elimina el trazado que dejaban las fibras circulares haciendo una capa interna totalmente lisa. Con esta mejora se lograron hacer conductos con una luz de 1 mm con muy buen aspecto físico.

La longitud de los soporte depende particularmente de como se tome el intestino delgado, si las fibras son orientadas de forma longitudinal al molde, se pueden obtener moldes tan largos como sea posible limpiar el intestino sin romperlo, pero de lo contrario su longitud está limitada al perímetro circular del intestino.

4.2 Caracterización de los conductos de SIS

4.2.1 Pruebas Mecánicas

El intestino delgado tiene unas fibras que favorece la orientación de forma longitudinal a éste, por esta razón el módulo de elasticidad para esta dirección es mayor que en la dirección transversal cuando se hacen las pruebas con la SIS deshidratada. Cuando se hicieron las pruebas con la SIS previamente hidratada se intentó estandarizar la prueba hasta el punto que se hidrataban con gotero y permanecían hidratadas por el mismo tiempo, pero al montar las probetas se perdía mucha agua por goteo y en algunos casos era necesario para montar la probeta en las mordazas. Por esta razón es posible que cambiara tanto el comportamiento entre las orientaciones ya que dependía directamente de la hidratación de la probeta lo que lograba darle una mayor elasticidad por lo que se recomienda hacer las pruebas en el medio. En general las pruebas en la SIS cuando están deshidratadas se comportan linealmente hasta 1,5% mientras que hidratada se calculaba el módulo de elasticidad hasta un 15% de elongación, el

módulo de elasticidad disminuye dramáticamente pero esto beneficia a la compatibilidad entre el conducto y la arteria. Es curioso ver la alta resistencia del conducto de 2 capas orientadas longitudinalmente en comparación con el mismo de 4 capas, principalmente se debe a que el espesor de los conductos de 2 capas era de solo 0,06 mm. mientras que en el de 4 capas era 0,167 mm. Es difícil controlar el que queden bien pegadas las capas y eliminar totalmente las burbujas este problema se agudiza a medida que se tienen mas capas en el conducto por la rugosidad del mismo.

Utilizando las membranas de forma longitudinal se pueden fabricar conductos de mayor longitud y las propiedades mecánicas con la SIS hidratada se asemejan a la de la arteria nativa que se reemplaza en la anastomosis.

Se observo que la orientación de la membrana cambia las propiedades mecánicas del conducto, en las pruebas mecánicas de los conductos deshidratados era clara la diferencia pero una vez se hicieron las pruebas hidratando estos conductos la orientación en sentido longitudinal no permanecía siendo la más tenaz. Ya se explicó las dificultades que se presentaron en la prueba de los conductos hidratados y por esta razón se considera que se debe respetar la jerarquía del módulo de elasticidad que proporciona la prueba de tensión deshidratada.

4.2.2 Pruebas Histopatológicas

Las pruebas en los conductos fueron satisfactorias ya que no tienen células viables, es aconsejable hacer una caracterización con microscopía electrónica sobre una población aleatoria para ver como está organizada la matriz de colágeno y si en alguna medida el tratamiento mecánico o químico altera las fibras de colágeno.

4.3 Modelo in vivo

El modelo animal fue muy acertado ya que reúne las características principales que son el diámetro inicial del conducto pues la carótida oscila entre 5 mm y que al tratarse de terneros neonatos están en crecimiento. Sin embargo es importante mirar otras alternativas para disminuir costos de mantenimiento y transporte, además de buscar otro animal que sea más fácil de manipular.

En lo posible es de gran ayuda programar varios procedimientos en un mismo día y ojala los siguientes se hicieran a los 15 días exactamente para poder disponer del radiólogo o del cirujano cardiovascular si este es el mismo que hace el ECO Doppler.

4.3.1 Evaluación del Desempeño (no invasivo)

Es ideal que el ECO Doppler lo realice un especialista vascular periférico ya que la experiencia permite hacerlo en menor tiempo y con mucha más certeza. Se debe hacer las mediciones de diámetro, espesor de pared y velocidad del flujo para la carótida distal, proximal y para el injerto. También es importante evaluar el desempeño de la otra arteria con el fin de ver el cambio en los flujos durante el tiempo y a la hora de normalizar se tiene el dato de la evolución normal de la arteria.

El día del sacrificio es necesario hacer el ECO Doppler ya que mediante este método se obtiene una mejor lectura de los diámetros que se desea estudiar y es probable que el espesor de pared sea mas claro en este punto ya que en la disección se retiran varias capas de tejido que se han adherido a la adventicia.

4.3.2 Evaluación del Desempeño (invasivo)

Esta toma de datos es de gran importancia y en este punto es donde se recopila la gran mayoría de la información de los experimentos. Obtener la curva esfuerzo – deformación de cada uno de los tejido proporciona suficiente información para cuantificar la evolución desde la SIS por si sola hasta el neoendotelio formado sobre ésta, además que estos resultados permiten hacer los cálculo del cambio de la velocidad de propagación de onda, la impedancia y la distensibilidad respecto al tiempo.

Los resultados teóricos de la velocidad de onda y la impedancia fueron muy satisfactorios en principio para el cálculo de estas propiedades el día cero se utilizaron las pruebas mecánicas de la SIS de 4 capas hidratadas y se vió que la velocidad de la propagación de onda (C_0) es 2,5 mayor en el conducto que el de la arteria nativa, así mismo ocurría con la impedancia pero esta era menos de 2 veces la del conducto en comparación con la arteria nativa. La distensibilidad

como es de esperarse es mayor en la arteria que en el conducto y se puede agregar que se deforma un 20% la arteria por cada mmHg que el conducto. En este punto se dice que se inicia con un material no muy diferente en cuanto a las características mecánicas con respecto a la arteria nativa, este podría ser aun mas parecido disminuyendo el número de capas ya que un conducto de 2 capas sería suficiente para brindar el soporte por el tiempo necesario para que se de la remodelación. Sin embargo con 4 capas se tiene la certeza que el material va a estar presente hasta que se remodele la arteria sobre este, sin peligro que antes de esto se degrade la SIS por completo.

Los resultados de los 45 días diferían mucho de lo que era el conducto en un principio esto se debe principalmente al periodo de reabsorción de la SIS y a la aparición de tejido endotelial sobre esta, en este periodo se presenta hiperplasia, disminución del diámetro y debilidad de la pared del conducto por la misma degradación. Todas las características anteriores se reflejan en una velocidad de propagación de onda más alta en el conducto, mayor impedancia y una menor distensibilidad.

A los 90 días nuevamente se observa un comportamiento parecido al del día de la implantación, eso quiere decir que la velocidad de onda recupera los órdenes de magnitud de la arteria nativa y el conducto empieza a recuperar distensibilidad. A los 180 días este comportamiento se mantiene con un parecido cada vez mayor al de la arteria nativa. El aspecto visual del injerto explantado en su interior y el de la arteria nativa son muy parecidos, difícilmente se pueden distinguir las suturas y su aspecto es liso de color blanco y brillante.

Las pruebas histológicas son muy importantes sobretodo en las primeras etapas de la experimentación, las tinciones de hematoxilina - eosina y tricrómico elástica proporcionan una información muy valiosa de la endotelización y su remodelación, a los 180 días estas pruebas demostraron que el injerto se integró completamente y a juzgar por el comportamiento de las propiedades de la pared arterial corroboramos estos resultados. En ningún momento se puede cuantificar con estos métodos por eso es necesario el uso de inmunoperoxidasas.

Volviendo a la velocidad de onda debe haber una correlación con la velocidad del flujo que mide el ECO Doppler, haciendo más experimentos se

obtienen datos de forma discreta de la velocidad de onda y se verificaría que tiene un comportamiento similar al de la velocidad del flujo. De esta forma se podría llegar a mantener los animales con vida por más tiempo y recurrir a tomar biopsias para corroborar que hay un funcionamiento normal del endotelio.

5 CONCLUSIONES

El propósito de este proyecto consistió en hacer un estudio de la remodelación de la pared arterial utilizando conductos de submucosa intestinal (SIS).

Se desarrolló un modelo animal que permitió evidenciar la remodelación de la pared arterial sobre soportes de submucosa intestinal de porcino desde distintos ángulos. El aspecto quizás de mayor interés fueron las patologías porque estas indican claramente lo que realmente está sucediendo a nivel celular. Es un hecho que estos conductos promueven la regeneración celular y que de hecho logran remodelar la pared arterial, esto significa que la pared arterial como tal recuperó sus componentes y su funcionalidad. Esto lo vimos desde el punto de vista histopatológico porque se logró hacer la diferenciación de las capas de la arteria y mecánicamente vimos como se diferenciaban el conducto de SIS y la arteria en sus etapas iniciales, y lo similares que llegan a ser con el paso del tiempo. Lastimosamente el número de casos es insuficiente para tener la certeza estadística de la eficacia de los conductos, por lo tanto es recomendable iniciar otro modelo con una aplicación más desafiante para estos conductos.

El protocolo de implantación indica que los conductos de SIS son previamente hidratados en solución salina y heparina, las pruebas mecánicas de estos conductos de 4 capas previamente hidratados mostraron estar acorde con el comportamiento de la arteria y con este número de capas se minimiza el riesgo de que se reabsorba el material antes de que se forme endotelio.

La discusión sobre la orientación de las fibras en los conductos de SIS resulta irrelevante para la orientación del tejido nativo, ya que en el momento de presentarse una endotelización del conducto lo más probable es que se respete la orientación de las fibras del tejido vascular nativo. Por lo tanto es aconsejable utilizar el que se asemeje a las características mecánicas de la arteria.

Es importante determinar cual es el paso a seguir en la experimentación de estos conductos, probablemente se pueden hacer un modelo que no sea tan costoso y que se de un cambio mas drástico en los diámetros con el paso del tiempo. La sugerencia es quizás un modelo en porcino de 5 kilos los cuales ganan

peso con mucha facilidad en muy poco tiempo y con los resultados de estos experimentos se puede someter el uso de estos dispositivos a un comité de investigación clínica.

En la experimentación es muy importante trabajar de forma rigurosa, de tal forma que tenga validez científica. Es probable que a medida que se avanza en el proyecto surjan soluciones más adecuadas y posibilidades de mejora. Sin embargo es indispensable mantener los procedimientos como se plantearon desde un principio con el fin de que no se le agreguen variables al proceso. La mejora es un proceso continuo y cada oportunidad debe manejarse de forma paralela para que tenga cabida en un proceso aparte y no se debe incluir arbitrariamente si de esto pueden depender los resultados finales del proyecto.

Por último es determinante saber que información deseo obtener de las pruebas a las que estoy sometiendo el dispositivo durante el proyecto y cada uno de esas pruebas debe arrojar resultados que determinen el éxito de las pruebas y del dispositivo sin tener que esperar a obtener todos los resultados del proyecto. Es decir cada variable que estoy midiendo debe brindar una información cuantitativa en ese instante de tiempo, en el caso de este estudio de la evolución en la remodelación de los soportes de SIS.

GLOSARIO

CEEA: Comité de Ética de Experimentación Animal

ECM: Matriz Extracelular

SIS: Small Intestine Submucosa

mm: milímetro

Hg: Mercurio

KPa: Kilo Pascal

MPa: Mega Pascal

PBS: Buffer Fosfato de Sulfato.

PTFE: Polytetrafluoroethylene

BIBLIOGRAFÍA

1. Dinnar, U. Cardiovascular fluid dynamics. CRC PRESS inc. Florida 1981
2. Tabima D. Desarrollo de una metodología para la preparación y evaluación de matrices biodegradables usadas para el crecimiento de fibroblastos. Proyecto de postgrado (Magíster en Ingeniería Mecánica) Universidad de Los Andes. Bogotá
3. Teezcaner A, G. Köse and V. Hasýrcý. Fundamentals of tissue engineering: Tissues and applications. *Technology and Health Care* 2002; 10: 203-216
4. BIOMATERIALS SCIENCE 2ed. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. Academic Press 2004
5. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al: Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001; 7:1035.
6. Therrien J, Siu S, McLaughlin P, et al: Pulmonary valve replacement in adults late after repair of tetralogy of Fallot: are we operating too late? *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1670.
7. Adult Congenital Heart Disease Hillel Laks, Daniel Marelli, Mark Plunkett, Jonah Odum, Jeff Myers.
8. Interventional and Surgical Cardiovascular Pathology: Clinical Correlations and Basic Principles. Philadelphia, WB Saunders, 1989. C: Reproduced by permission from Kadoba K, Schoen FJ, Jonas RA: Experimental comparison of albumin-sealed and gelatin-sealed knitted Dacron conduits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103:1059.
9. Janvier G, Baquey C, Roth C, et al: Extracorporeal circulation, hemocompatibility and biomaterials. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:1926.
10. Cirugía Vascul ar – Principios y Técnicas. Henry Haimovici. Salvat Editores 1986
11. Schoen FJ, Edwards WD: Pathology of cardiovascular interventions, including endovascular therapies, revascularization, vascular replacement, cardiac assist/replacement, arrhythmia control, and repaired congenital

- heart disease, in Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ (eds): *Cardiovascular Pathology*, 3rd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2001; p 678.
12. Joachim Kohn and Robert Langer, Biomaterials Science. *Bioresorbable and bioerodible materials*. Page 64-73
 13. Marshall SE, Tweedt SM, Greene CH, et al: An alternative to synthetic aortic grafts using jejunum. *J Invest Surg* 2000; 13:333
 14. Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, et al: Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation* 2001; 71:1631
 15. Roeder R, Wolfe J, Lianakis N, et al: Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res* 1999; 47:65
 16. Sandusky GE, Lantz GC, Badylak SF, et al: Healing comparison of small intestine submucosa and ePTFE grafts in the canine carotid artery. *J Surg Res* 1995 Apr; 58 (4):415-20
 17. Sandusky GE Jr, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz G, et al: Histological Findings after in vivo placement of small intestine submucosa vascular grafts and saphenous veins grafts in the carotid artery. *Am J Pathol*, 1992 Feb; 140 (2):317-24
 18. Tam Huynh, Ginger Abraham, James Murray, Kelvin Brockbank, et al: Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, NOV; (17) 1999
 19. Badylak SF, Coffey AC, Lantz G, et al: Comparison of the resistance to infection of the intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model. *J Vasc Surg*, 1994 Mar; 19 (3):465-72
 20. Hirsh et Al. *GUIDE TO ANTICOAGULANT THERAPY: HEPARIN. A STATEMENT FOR HEALTHCARE PROFESSIONALS FROMS THE AMERICAN HEART ASSOCIATION.* American Heart Association. *Circulation*. 2001;103:2994
 21. *Fundamental of Modern Manufacturing*, 2nd edition, Mikell P. Groover. Stress – Strain relationships, section 3.1 page 39

22. Fabrication of elastomer arterial models with specified compliance, M. STEVANOV, J. BARUTHIO, AND B. ECLANCHER *Université Louis Pasteur, Faculte de Medecine, Institut de Physique. J Appl Physio* 88: 1291–1294, 2000.
23. Gravanis MB. *Cardiovascular Pathophysiology*. New York: Mc-Graw-Hill, 1987, p. 318–321.
24. Urchuk SN, Fremes SE, and Plewes DB. In vivo validation of MR pulse pressure measurement in an aortic flow model: preliminary results. *Magn Reson Med* 38: 215–223, 1997.
25. Rapid Prototype Design of an Optimum Vascular Graft, J Chung, J Li, J Matonick.
26. Lindberg K, Badylak S. Porcine small intestine submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins, *burns* 2001; 27: 254-266.
27. Keuren et Al. COVALENTLY-BOUND HEPARIN MAKES COLLAGEN THROMBORESISTANT. Maastricht University. The Netherlands.
28. Pieper et Al. DEVELOPMENT OF TAILOR-MADE COLLAGEN-GLYCOSAMINOGLYCAN MATRICES: EDC/NHS CROSSLINKING, AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS. University of Nijmegen, The Netherlands.
29. Sacks MS, Gloeckner C. Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of SIS.