

## **USO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR COMO MATERIAL PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**Diana M Sanchez-Palencia, Javier Navarro, Juan C. Araque, Juan B. Umaña,  
Alvaro F. Guerrero, Lina M. Quijano, Nestor Sandoval, Rocio Lopez, Juan C.  
Briceño**

Trabajo de Grado

Fundación Cardioinfantil - Instituto de Cardiología

Departamento de Cirugía Cardiovascular

Universidad del Rosario

Facultad de Medicina

Bogotá

Marzo 2014

Universidad del Rosario

Facultad de medicina

Uso de matriz extracelular como material para ingeniería de tejidos

Grupo de Ingeniería Biomédica, Línea de Ingeniería de Tejidos

Fundación Cardioinfantil - Instituto de cardiología

Universidad de los Andes

Trabajo de grado - Posgrado en cirugía cardiovascular

Investigador principal: Dr. Juan Carlos Briceño

Investigadores asociados: Diana M Sanchez-Palencia, Javier Navarro, Juan Camilo Araque, Juan B. Umaña, Alvaro F. Guerrero, Lina M. Quijano, Nestor F. Sandoval, RocioLopez.

Asesor temático: Dr. Nestor Fernando Sandoval, Dra RocioLopez

### **Nota de Salvedad de Responsabilidad Institucional**

“La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, a mi novia

A todo el equipo de trabajo

## Tabla de contenido

<b>Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>11</b>
<b>Marco teórico .....</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos e hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<i>Objetivo general .....</i>	<i>26</i>
<i>Objetivos Secundarios .....</i>	<i>26</i>
<b>Metodología.....</b>	<b>29</b>
<i>Procedimiento de análisis microestructural basado en imágenes.....</i>	<i>30</i>
<i>Procedimiento quirúrgico general.....</i>	<i>30</i>
<i>Cuidado postoperatorio.....</i>	<i>32</i>
<i>Valoración postquirúrgica de permeabilidad .....</i>	<i>33</i>
<i>Eutanasia .....</i>	<i>33</i>
<i>Procedimiento de toma de muestras .....</i>	<i>33</i>
<i>Protocolo de análisis mecánico .....</i>	<i>34</i>
<i>Prueba de Tensión .....</i>	<i>34</i>
<i>Prueba presión-volumen.....</i>	<i>35</i>
<i>Evaluación Histológica e inmunohistoquímica.....</i>	<i>36</i>
<i>Cuantificación de la regeneración.....</i>	<i>38</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>39</i>
<i>Aspectos éticos.....</i>	<i>39</i>
<b>Resultados.....</b>	<b>40</b>
<i>Permeabilidad y aspecto macroscópico.....</i>	<i>40</i>
<i>Valoración Histológica.....</i>	<i>41</i>
<i>Valoración inmunohistoquímica .....</i>	<i>43</i>
<b>Discusión .....</b>	<b>45</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo2.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo3.....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>54</b>

## Índice de tablas y figuras

<i>FIGURA 1. INJERTOS VASCULARES SIS.....</i>	<i>29</i>
<i>TABLA 1. CRITERIOS DE REGENERACIÓN.....</i>	<i>39</i>
<i>FIGURA 2. IMAGNES DE INJERTOS SIS.....</i>	<i>41</i>
<i>FIGURA 3. IMÁGENES HISTOLÓGICAS.....</i>	<i>43</i>
<i>FIGURA 4. PUNTUACIÓN HISTOLÓGICA.....</i>	<i>44</i>

**Introducción:**

La evaluación de injertos vasculares de submucosa de intestino delgado para la regeneración de vasos sanguíneos ha producido una permeabilidad variable (0-100%) que ha sido concurrente con la variabilidad en las técnicas de fabricación.

**Metodología:**

Investigamos los efectos de fabricación en permeabilidad y regeneración en un diseño experimental de 2<sup>2</sup>factorial que combino: 1) preservación (P) o remoción (R) de la capa stratum compactum del intestino, y 2) deshidratada (D) o hidratada (H), dentro de cuatro grupos de estudio (PD, RD, PH, RH). Los injertos fueron implantados en las Arterias Carótidas de porcinos (ID 4.5mm, N=4, 7d). Permeabilidad, trombogenicidad, reacción inflamatoria, vascularización, infiltración de fibroblastos, perfil de polarización de macrófagos y fuerza tensil biaxial fueron evaluadas.

**Resultados:**

Todos los injertos PD permanecieron permeables (4/4), pero tuvieron escasa vascularización e infiltración de fibroblastos. El grupo RD permaneció permeable (4/4), presentó una extensa vascularización e infiltración de fibroblastos, y el mayor número del fenotipo de macrófagos (M2) asociado a regeneración. El grupo RH presentó menor permeabilidad (3/4), una extensa vascularización e infiltración de fibroblastos, y un perfil dominante de M2. El grupo PH presentó el menor grado de permeabilidad, y a pesar de mayor infiltración celular que PD, exhibió un fenotipo de macrófagos dominante adverso. La elasticidad de los injertos R evolucionó de una manera similar a las Carótidas nativas (particularmente RD, mientras que los injertos P mantuvieron su rigidez inicial.

**Discusión:**

Concluimos que los parámetros de fabricación afectan drásticamente los resultados, siendo los injertos RD los que arrojaron mejores resultados.

Palabras Clave: SIS (submucosa de intestino delgado), Macrófago, Injerto vascular, Biomecánica de tejido blando, ingeniería de tejido arterial.

**Introduction:**

Evaluation of small intestine submucosa vascular grafts for the regeneration of blood vessels has produced variable patency (0-100%) that has been concurrent with variability in fabrication techniques.

**Methodology:**

We herein investigated the effects of fabrication on patency and regeneration in a  $2^2$  factorial experimental design that combined: 1) preservation (P) or removal (R) of the *stratum compactum* layer of the intestine and 2) dehydrated (D) or hydrated (H) state, into four study groups (PD, RD, PH, RH). Grafts were implanted in the carotid arteries of swine (ID 4.5 mm, n=4, 7d). Patency, thrombogenicity, inflammatory reaction, vascularization, fibroblast infiltration, macrophage polarization profile and biaxial tensile mechanics were assessed.

**Results:**

All PD grafts remained patent (4/4) but had scarce vascularization and fibroblast infiltration. RD had sustained patency (4/4), extensive vascularization and fibroblast infiltration and the highest number of regeneration-associated phenotype macrophages (M2). RH had lower patency (3/4), extensive vascularization and fibroblast infiltration, an M2 dominant profile but less M2 macrophages compared to RD. PH had the lowest patency (2/4), and in spite of higher cellular infiltration than PD, they exhibited a dominant adverse macrophage phenotype. Elasticity of R grafts evolved towards that of native carotids (particularly RD), while P grafts kept their initial stiffness.

**Discussion:**

We concluded that fabrication parameters drastically affected the outcome criteria, with the best result produced by RD grafts.

**Keywords:** SIS (small intestine submucosa), macrophage, vascular grafts, scaffold, soft tissue biomechanics, arterial tissue engineering

## Introducción

Según las estadísticas más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la principal causa de muerte en el mundo, sin importar los ingresos del país, fue la enfermedad cardiovascular (ECV) (1). Aproximadamente, una de cada tres muertes es ocasionada por una enfermedad cardiovascular. Los últimos reportes para Colombia indican que esta tasa fue del 27% en el 2008 (1) y 29.1% en el 2009 [DANE], equiparando el número de muertes ocasionadas a cuenta de cáncer y accidentes combinados(2). De mayor gravedad aún para nuestro país, los últimos análisis indican que más del 80% de las defunciones causadas por las ECV en el mundo se producen en los países de ingresos bajos y medianos, como consecuencia de las deficiencias de los sistemas de salud de estos países (1).

En conjunto, la alta incidencia de ECV y el tratamiento de la enfermedad crónica imponen una alta demanda de estrategias terapéuticas para el reparo o creación de nuevos vasos sanguíneos. Desde hace cuatro décadas el tratamiento provisto ha sido el reemplazo del vaso sanguíneo afectado con injertos vasculares sintéticos o biológicos que restablecen el flujo adecuado de la sangre impedido por la enfermedad.

Los principios de la ingeniería de tejidos se usan actualmente en el desarrollo de injertos vasculares que provean las propiedades biológicas y mecánicas necesarias para el reemplazo exitoso de vasos sanguíneos en cuanto a permeabilidad del injerto y predicción del tratamiento. Estudios previos realizados por nuestro y otros grupos han demostrado que la matriz extracelular (MEC) obtenida del intestino delgado porcino puede ser usada como soporte para la reconstrucción de vasos sanguíneos. Las cualidades de esta reconstrucción comprenden la biocompatibilidad, alta tasa de permeabilidad y baja incidencia de infección propias de los injertos biológicos, por medio de las ventajas de manufactura de los injertos sintéticos. No obstante dichas ventajas, se han reportado resultados variables de la tasa de permeabilidad del injerto en estudios donde se han usado diferentes métodos de obtención de la MEC y manufactura del injerto vascular final.

Estos procesos tienen factores que en diferentes combinaciones parecen favorables en menor o mayor grado para la reconstrucción exitosa de un vaso sanguíneo:

- a) Presencia de una capa densa de colágeno en el lumen del injerto vascular como el stratumcompactum del intestino o una capa delgada del colágeno fibrilar denso
- b) Estado de hidratación del injerto

En vista de lo anterior, el tema del trabajo se centra en el estudio y evaluación de la combinación de métodos de obtención y manufactura de injertos vasculares de MEC, con el fin de aportar a la meta de proveer una solución predecible y eficaz a las ECV que involucran el reemplazo de un vaso sanguíneo. Se intenta entonces resolver la siguiente pregunta de investigación: Durante el proceso de manufactura de los injertos SIS, cual combinación de parámetros brinda mejores resultados en términos de permeabilidad y regeneración?

## **Justificación**

El desarrollo de este proyecto permitirá contribuir a hacer más cercana la posibilidad de usar injertos vasculares que reparen y reconstruyan la estructura y funcionalidad de vasos sanguíneos que ponen en riesgo la vida humana a causa de enfermedades cardiovasculares o tratamientos que requieren el uso de un vaso sanguíneo sano como la hemodiálisis. Dicha contribución será en nuevo conocimiento sobre un método de obtención y manufactura de injertos vasculares de matriz extracelular que sea más favorable y predecible para la reconstrucción exitosa de vasos sanguíneos.

## Marco teórico

### *Enfermedad cardiovascular en vasos centrales*

Los vasos centrales (aorta, arterias carótidas, arterias subclavias, arterias pulmonares, venas cavas, arteria renal, venas yugulares, arteria coronaria) ubicados en la región abdominal y cervical son comúnmente afectados por la aterosclerosis, enfermedad en la que depósitos de placa sobre la pared vascular obstruyen el flujo sanguíneo. Esta enfermedad afecta principalmente las arterias carótidas y las arterias coronarias, además de vasos periféricos. Por su parte, la aorta también presenta daños a causa de la aterosclerosis, pero en este caso es debido a un endurecimiento de la pared vascular que genera un debilitamiento y una posterior dilatación que puede conllevar a la ruptura del vaso y poner en alto riesgo la vida del paciente. Los daños en los vasos centrales generan complicaciones como la enfermedad isquémica del corazón, donde hay una deficiencia en el flujo sanguíneo que irriga el músculo cardíaco o la enfermedad cerebrovascular, donde un fragmento de placa desprendida puede generar la oclusión de un vaso sanguíneo en el cerebro. La enfermedad isquémica del corazón fue en 2009 en Colombia, según el DANE, la primera causa de muerte con el 14% de todas las muertes en ese año (1). Muy cerca de ésta, la enfermedad cerebrovascular cobró el 7.1% de las muertes en Colombia en 2009 (1). Estas estadísticas ubican a Colombia en la misma situación que se enfrenta a nivel internacional: según la OMS la primera causa de muerte a nivel mundial en 2008 es la enfermedad isquémica del corazón (2).

En particular, un aneurisma de aorta se define como una dilatación de la aorta de más de 3 cm y se clasifica según su ubicación anatómica; puede ser abdominal o torácico (3). Los factores de riesgo más importantes son género masculino, edad avanzada y ser fumador (3). En general, para dilataciones entre 3 y 5 cm se debe optar por un manejo médico y seguimiento, para dilataciones de más de 5.5 cm se debe buscar tratamiento quirúrgico (3). Hay dos opciones de tratamiento quirúrgico de los aneurismas de aorta abdominal, cirugía abierta de abdomen o cirugía intervencionista percutánea. La mortalidad de la cirugía abierta es de 4.6 a 4.7% mientras que la de la intervención percutánea es de 1.2 a 1.6% (4). En la cirugía abierta se reemplaza el segmento enfermo de aorta por un injerto o sintético o biológico, mientras que en la cirugía intervencionista se reemplaza la luz del aneurisma por el implante. La desventaja de la

técnica abierta es la necesidad de pinzamiento de la aorta, lo que hace que sea un procedimiento con altas comorbilidades (4). Por otro lado, el tratamiento percutáneo de la enfermedad tiene ventajas de ser un procedimiento mínimamente invasivo y de no requerir el pinzamiento de la aorta, sin embargo presenta un alto número de complicaciones técnicas (relativas a las características del dispositivo) y quirúrgicas, por lo que el porcentaje de reintervención sube a 20% a cuatro años (4). Los dos materiales más usados para el reemplazo vascular con cirugía abierta de abdomen o con intervención percutánea son el PET (polietileno tereftalato) y el ePTFE (politetraflúor etileno expandido) (5), sin embargo, es conocido que los materiales sintéticos utilizados para tratar ésta y otras patologías del sistema cardiovascular son propensos a presentar complicaciones hemodinámicas adversas y una reacción de cuerpo extraño por parte del sistema inmune (6). Adicionalmente, se reconoce que el uso de auto injertos es ventajoso en cuanto a aceptación por parte del hospedero y durabilidad del tratamiento, tanto así que para tratar la enfermedad isquémica por medio de un puente coronario, el *gold standard* es usar la arteria mamaria interna para defectos en la arteria coronaria descendente anterior y la vena safena para hacer los puentes de las otras lesiones (7). Dado lo anterior, se han buscado otras alternativas al uso de puentes venosos como implantes sintéticos o implantes orgánicos de humanos y otras especies de animales, que produzcan mejores resultados a largo plazo.

#### *Necesidad de injertos vasculares para hemodiálisis*

Según la Sociedad Americana de Nefrología, 350.000 estadounidenses tienen enfermedad renal terminal dependiente de diálisis, y se calcula que para el año 2020, serán 500.000 los pacientes que requerirán esta intervención (8); en Colombia, actualmente 6.000 pacientes con enfermedad renal crónica son dependientes de diálisis cada año (9). Con el aumento de la incidencia, la creación de accesos vasculares para hemodiálisis se posiciona como la cirugía vascular más realizada en estos pacientes (8). En general, se prefiere la creación de fístulas arterio-venosas nativas debido a que presentan la menor tasa de falla terapéutica a largo plazo (10); sin embargo, cuando el estado de los vasos no permite realizar una fístula nativa, se elige la construcción de una fístula arterio-venosa (FAV) con injerto como acceso vascular para la realización de Hemodiálisis, siendo de gran importancia que este acceso vascular sea confiable, ya que

el tratamiento puede requerir de hasta tres sesiones semanales de 4 o más horas de duración, por el resto de la vida del paciente.

La evidencia favorece como intervención de primera línea la creación de FAV nativas. Generalmente se prefieren las fistulas radio-cefálica o braquio-cefálica, por presentar excelente patencia, baja incidencia de complicaciones y morbilidad perioperatoria aceptable. Una dificultad que se presenta con esta intervención es el fracaso primario (definido como la incapacidad de utilizar la fistula para hemodiálisis, generalmente por trombosis posoperatoria o falta de maduración) que ocurre entre el 10 y el 30% de los casos, puede ser hasta del 50% en diabéticos, ancianos y mujeres (8). Otra limitación de las FAV autógenas es el tiempo de maduración. Se considera que después de 4 a 6 semanas de creación, las fístulas radiocefálicas y humerocefálicas deben ser aptas para su uso. Sin embargo, se ha reportado que el 30% de estas fístulas no ha madurado a los 3 meses de su creación, y entre el 28% y un 53% de ellas nunca maduran adecuadamente.

La razón por la cual a pesar de este inconveniente las FAV autógenas siguen siendo el *Gold Standard* radica en su desempeño a largo plazo. La durabilidad de las FAV nativas varía entre 3 y 7 años, mientras que la durabilidad de las FAV con injertos sintéticos es de sólo 12 a 18 meses, debido a infección, estenosis y trombosis tardía del injerto (8). Por otro lado, en algunos pacientes las venas de los antebrazos son muy delgadas para realizar la fistula nativa, o estas venas ya han sido utilizadas con anterioridad para realizar procedimientos relacionados con Enfermedad Vascular Periférica o puentes coronarios. Por esto, el 38% de los pacientes que requieren hemodiálisis se benefician del uso de injertos sintéticos o biológicos para suplir esta necesidad.

Los injertos de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) han sido utilizados con entusiasmo debido a su porosidad, adhesión tisular y pliability. Sin embargo, la infección del injerto ocurre en el 6 a 12% de los injertos, 55% de los cuales se preservan con tratamiento antibiótico; la formación de pseudoaneurismas ocurre hasta en el 6% de los casos, y el síndrome de robo sanguíneo en el 2 a 3%. La hipertensión venosa y formación de seroma ocurre en menos del 10% de los pacientes (11). Con estas complicaciones, se reportan tasas de permeabilidad primaria de 76, 55, 43% a los 6, 12 y 24 meses, respectivamente (11, 12). Otros autores han reportados tasas mucho más

bajas de permeabilidad primaria, siendo 20 y 14% a 1 y 2 años, respectivamente (8). La permeabilidad primaria asistida (tiempo transcurrido hasta que se produjo la primera trombosis del mismo con reparación) es de 60% al año, y la permeabilidad secundaria (tiempo transcurrido hasta la pérdida definitiva del acceso) es de 90% al año de implantación (13). El tiempo de maduración de las fístulas con injertos de PTFE es considerablemente más corto que el de las fístulas autógenas; se reportan tiempos de maduración con estos injertos tan cortos como 14 días, siendo el ideal entre 3 y 6 semanas (14, 13, 15).

Los desenlaces encontrados con los injertos sintéticos cobran aún más importancia al considerar que su uso en diabéticos se asocia con mayor incidencia de infección y síndrome de robo y que el 40% de los pacientes que requieren hemodiálisis son diabéticos (11).

Los accesos vasculares son la primera causa de morbilidad en los pacientes que requieren hemodiálisis causando entre el 17 y el 25% de las hospitalizaciones en este grupo de pacientes en Estados Unidos (16, 12). La mayoría de los pacientes que requieren hemodiálisis tendrán fracasos de sus FAV en múltiples localizaciones, de manera que el costo total relacionado con la creación de accesos vasculares en Estados Unidos excede un billón de dólares anuales, con un aumento del 6% anual (8). No existe consenso mundial sólido sobre cuál es el material, sintético o biológico, que se debe usar para la construcción de la FAV en pacientes con enfermedad renal que requieren hemodiálisis (11).

La ingeniería de tejidos ha procurado soluciones prometedoras frente a este escenario con el diseño de un injerto que cumpla todos los requerimientos para tener un desempeño óptimo (12). Para esto, el diseño del injerto debe tener en cuenta las propiedades mecánicas y biológicas de los vasos sanguíneos (8); en cuanto a las propiedades mecánicas, debe proveer la suficiente resistencia para soportar la presión de pulso, el flujo arterial y las punciones (11); en cuanto a las propiedades biológicas, debe ser antitrombogénico, inmunológicamente inerte y resistente a la infección (8). Adicionalmente, debe poder ser manufacturado a gran escala y a un costo razonable (17,11). Dado que la hemodiálisis es una terapia crónica, la duración del acceso vascular es un punto de suma importancia en el diseño y manufactura de un injerto para

FAV, de manera que se eviten reintervenciones quirúrgicas, que generan costos e incomodidades para el paciente.

Los estudios han demostrado que los injertos biológicos realizados por ingeniería de tejidos tienen tasas de permeabilidad satisfactorias a largo plazo, menor incidencia de infección y de robo sanguíneo, incidencia baja de estenosis y mejor accesibilidad en caso de reintervención al compararlos con los injertos sintéticos (17, 11).

#### *Opciones actuales para ingeniería de tejidos de vasos sanguíneos de diámetro pequeño*

Comprenden el uso de injertos biológicos o sintéticos. El *gold standard* está dentro de los injertos biológicos, principalmente la arteria interna mamaria y como segunda opción la vena safena (18, 19), que producen una mejor respuesta del hospedero y pueden ser permeables a largo plazo. Sin embargo, su uso es restringido por disponibilidad limitada debida a enfermedad, uso previo en puente coronario, uso previo en revascularización periférica o diferencias en las propiedades mecánicas deseadas en la ubicación final (11, 20).

Otras opciones usadas comúnmente son injertos sintéticos hechos de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) o fibra de polietilenteraftalato (conocido comercialmente como Dacron®). Estos injertos tienen durabilidad limitada debido a la ocurrencia de trombosis en el injerto y a un alto riesgo de infección; sin embargo, los injertos de ePTFE se usan desde finales de la década de los 70 a pesar de la alta incidencia de oclusión e infección (11). Los injertos sintéticos también carecen de la habilidad de crecer con un paciente pediátrico y de mayor importancia para esta propuesta, tienen tasas de permeabilidad bajas y no repetibles en aplicaciones de diámetro menor a 5 mm (tasas de permeabilidad entre 12 y 85% en periodos entre 1 y 3 años (21, 11).

El uso de homoinjertos o aloinjertos también ha sido estudiado y aunque se ha encontrado que ambos proveen mejores resultados que el ePTFE, no se han obtenido resultados satisfactorios (22) probablemente en parte por la respuesta adversa del hospedero a procedimientos de entrecruzamiento a los que estos materiales son sometidos (22). Otras opciones incluyen injertos sintéticos endotelializando injertos

biológicos elaborados con técnicas de ingeniería de tejidos de cultivo de células (20), sin embargo estas opciones no exhiben aún tasas de permeabilidad satisfactorias y enfrentan dificultades en cuanto a la viabilidad comercial.

#### *Ingeniería de tejidos de vasos sanguíneos de diámetro pequeño*

En vista de la necesidad latente, la ingeniería de tejidos se ha convertido en una opción atractiva para tratar la enfermedad vascular y los esfuerzos en investigación están actualmente dirigidos en esa dirección. Los retos en diseñar injertos vasculares por medio de técnicas de ingeniería de tejidos comprenden proporcionar: 1) un soporte que es reemplazado con tejido nativo mientras provee resistencia suficiente para soportar las presiones fisiológicas; 2) propiedades antitrombóticas (20); y 3) señales humorales y mecánicas adecuadas (16). Por ende, el injerto ideal para el reparo de los vasos sanguíneos por medio de ingeniería de tejidos debería: exhibir propiedades biomecánicas iguales a las de los vasos sanguíneos nativos (16), dado que la diferencia en propiedades mecánicas ha sido asociada con perturbaciones que pueden generar reestenosis y falla del injerto (19); facilitar un rápido desarrollo del endotelio, dado que esta capa provee una superficie antitrombótica y evita el desarrollo de hiperplasia pseudointimal (16); permitir una rápida vascularización; y fomentar una respuesta del hospedero en la vía regenerativa en lugar de en la vía de cicatrización relacionada con una reacción de cuerpo extraño (6).

Dentro de la ingeniería de tejidos, el diseño de un soporte de matriz extracelular (MEC) ha sido identificado como un enfoque ventajoso en el que la MEC provee un sustrato que permite la adherencia de células, controla la estructura tridimensional (3-D) del tejido y contiene factores de crecimiento, señales para la adhesión celular y señales mecánicas (23). La submucosa del intestino delgado (generalmente conocida en el campo por las siglas en inglés SIS - *small intestinal submucosa*) es un soporte natural de MEC obtenido a partir de la decelurización del intestino delgado de mamíferos, que está conformado por varias capas: del exterior hacia el interior, tejidos mesentéricos, túnica serosa, túnica muscularis, túnica submucosa y túnica mucosa, donde la última está conformada a su vez por la lamina muscularis, mucosa, stratum compactum, lamina epitelial de la mucosa y lamina propia (24). Para aplicaciones de regeneración de tejidos, se ha encontrado que la túnica submucosa del intestino delgado porcino o felino

proporciona tasas de permeabilidad y propiedades mecánicas favorables, por lo tanto, la especie porcina es preferida generalmente como especie donante dada la alta disponibilidad de intestino porcino (25). La SIS es utilizada comercialmente para corregir defectos del esófago, pared abdominal, vejiga urinaria y quemaduras, entre otros (22).

### *Composición de las SIS*

Se ha reportado que la SIS está compuesta por colágeno en más de 90%, principalmente colágeno tipo I, proteína estructural que está presente en los tejidos en mayor cantidad y es ubicua en los reinos animal y vegetal (26). También hay cantidades menores de colágeno de tipo III, IV, V y VI (22)]. La molécula adhesiva fibronectina es secundaria en contenido de la SIS; posee ligandos para la adhesión de muchos tipos celulares y ha sido encontrada crítica en el desarrollo de estructuras vasculares de embriones en desarrollo (27). Otros componentes de la SIS son la proteína adhesiva laminina, glicosaminoglicanos (GAGs) que incluyen heparina, heparán sulfato, sulfato de condroitina, ácido hialurónico (22) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), la familia de factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento vascular endotelial. En consecuencia, la composición diversa de la SIS provee un complejo de moléculas organizado en su estructura tridimensional nativa que está dispuesto ventajosamente para ser usada como un soporte en procesos de regeneración de tejidos.

### *Resultados previos con ingeniería de tejidos de injertos vasculares de diámetro pequeño*

Badylak et al. estudió en varios modelos caninos de arteria de diámetro pequeño el reemplazo de vasos sanguíneos con injertos vasculares de SIS que comprendían la túnica submucosa, la laminamuscularis mucosa y el stratum compactum, donde el último fue mantenido como la superficie luminal del injerto. La fuente de la SIS fue autógena en los primeros estudios y posteriormente fue cambiada a porcina. Se obtuvo una tasa de permeabilidad de 75% después de 48 semanas con SIS autógena en un modelo canino de arteria carótida izquierda y arteria femoral derecha (diámetro interno promedio de 4.3 mm) (28). Estudios posteriores usando SIS porcina en un modelo

canino de arteria carótida (rango de diámetro interno entre 3.5 y 5.0 mm) produjeron tasas de permeabilidad de 83% (29) y 88% (21) hasta 180 días.

De otra parte, Huynh et al. (30) estudiaron injertos de SIS porcina donde el intestino fue limpiado mecánicamente y tratado químicamente para obtener una túnica submucosa acelular. Injertos de dos capas y 4.0 mm de diámetro fueron construidos y estudiados como un *shunt ex-vivo* en un modelo canino o como un injerto aórtico en un modelo lepórico; sin embargo, ambos injertos produjeron una respuesta trombogénica y 0% de permeabilidad. Una modificación posterior en la que una capa delgada (<100 micras) de colágeno fibrilar denso bovino tipo 1 fue depositado en el lumen del injerto produjo una tasa de permeabilidad de 100% en un modelo lepórico de arteria carótida. Por ende, a partir de estos resultados, se puede señalar que los injertos vasculares de SIS son prometedores pero aún exhiben tasas de permeabilidad variables que podrían hacerse más constantes por medio del entendimiento de las características estructurales (derivadas de los diferentes métodos de manufactura) de injertos que permanecen permeables.

#### *Proceso de Remodelación del tejido*

Se ha encontrado que procesos importantes en la remodelación o reemplazo de un vaso sanguíneo ocurren durante el primer mes de implantación del injerto (21, 31). Descripciones de las estructuras celulares y biológicas que surgieron durante el proceso de remodelación fueron reportadas en detalle por Badylak et al. [Sandusky 1992] y Huynh et al. (30). En resumen, en estos estudios se encontraron capilares después de dos días de implantación, células endoteliales después de siete días y endotelio después de 14 días. A los 28 días de implantación se encontraron células de músculo liso formando una nueva túnica media y a los tres meses después de la implantación se reconocieron nuevas túnicas íntima, media y adventicia. La remodelación estuvo prácticamente completa a los seis meses.

Por otro lado, en otros estudios se ha encontrado que la respuesta temprana a un injerto vascular involucra una migración de monocitos al material inmediatamente después de la implantación, con una diferenciación de los monocitos en macrófagos del tipo M-1 o M-2 (los cuales se subdividen en M-2a, M-2b, M2c). Se ha identificado que los

macrófagos M-1 hacen parte de la vía inflamatoria que conlleva a una respuesta inflamatoria y fibrótica, mientras que los macrófagos M-2 se han identificado como un fenotipo anti-inflamatorio que desencadena procesos de regeneración del tejido (6, 26)

### *Propiedades mecánicas*

Las paredes vasculares presentan propiedades no-lineales bastante claras y en general están descritos como anisotrópicos, propiedades que se utilizan para construir una expresión matemática descriptiva del comportamiento mecánico del material: las ecuaciones de energía de deformación (SEF, por sus siglas en inglés de *Strain-EnergyFunction*). En general, más allá de las suposiciones de los estudios, las primeras SEF planteadas eran primordialmente fenomenológicas, en el sentido de que los parámetros involucrados en las expresiones matemáticas no tenían ningún significado fisiológico. Sin embargo, a partir de los estudios de Holzapfel (32), Zulliger (33), Gundiah(34), Rezakhaniha (35), se han empezado a formular SEF basadas en los elementos constitutivos o la estructura de la pared (*structure-based SEF, constituent-based SEF*) (35)

Desde los estudios sobre la elasticidad de pieles animales de Lanir y Fung (36,37), la metodología de los procesos investigativos y planteamiento de SEF ha variado de gran manera. Debido a las características inherentes de capas y fibras en el material, los métodos han evolucionado basándose en diferentes maneras de determinar los ejes de evaluación de la muestra, la homogeneidad del campo esfuerzo-deformación y la concentración de esfuerzos debido al agarre de la máquina. Se debe mencionar, que la evolución tecnológica de las máquinas de ensayo biaxiales ha fomentado el cambio de metodologías y la obtención de datos mucho más precisos. Históricamente, los estudios realizados por Lanir y Fung en 1974 (38) marcan la pauta con respecto a la caracterización biaxial de materiales biológicos. De manera muy relevante, se consideran los cambios introducidos por Vito y Choi (38, 39) para identificar la manera en que se encuentran alineadas las fibras naturales de cada muestra. Además de esto, se toman como referencia los trabajos realizados por Sacks y Choung con respecto al comportamiento anisotrópico de muestras de miocardio ventricular canino (38).

De manera específica, el GIB ha venido trabajando, en los últimos años, con diversos tipos de injertos, posibles candidatos derivados del estudio de la SIS (40, 41, 42, 43). Una gran cantidad de investigaciones se han realizado para determinar la viabilidad y seguridad del injerto. Los resultados obtenidos hasta el momento no alcanzan a caracterizar el tejido biológico de manera precisa y completa. El trabajo de Aristizábal implementó el uso de la máquina de ensayos biaxial sobre injertos de SIS, demostrando claramente que la caracterización se ve muy afectada por la diferencia entre un modelo uniaxial y uno biaxial (diferencias de alrededor del 60% para los módulos en cada dirección del tejido). El uso de la máquina de ensayos biaxiales especial para materiales biológicos, ha permitido llevar a cabo caracterizaciones cada vez más precisas. Los trabajos de Castañeda (44) y Navarro (42, 45) se enfocaron en la comparación entre SIS y material vascular animal, con el fin de determinar la viabilidad del primero como aplicación en injertos vasculares al comparar ingenierilmente ambos materiales y definiendo protocolos experimentales que permitan evaluar los diferentes materiales de manera apropiada y consistente. Para obtener una descripción completa del comportamiento elástico de los tejidos de busca realizar pruebas de carácter biaxial (equibiaxial y cortante) y uniaxial, variando las cargas en sentidos perpendiculares de manera estática y fluctuante, a manera de simular los estados en un organismo vivo (46, 36,47, 38,42 y 45)

Cada muestra se sumerge en solución salina al 0.9% a 37°C por 20 min (43). Las variables de pre-condicionamiento y la forma de aplicación de la carga se ven resumidas en las Tablas 1 y 2 respectivamente. Debido a las fibras del material y anisotropía, se busca pre-condicionar la muestra hasta un estado homogéneo para conseguir una respuesta precisa en el área de medición. Por esto, el protocolo de la prueba incluye someter la muestra a ciclos de cargas menores antes de la elongación final, mediante una carga sinusoidal de baja magnitud (46, 37).

Estructuralmente, de las múltiples sustancias componentes de la pared (capa endotelial, fibras de colágeno, fibras de elastina, músculo liso y sustancia base), la relación entre elastina y colágeno predomina en el comportamiento elástico del vaso. La elastina tiene baja resistencia elástica y provee la resistencia circunferencial necesaria para vasos sometidos a altas presiones. El colágeno tiene forma helicoidal característica con una determinada longitud en reposo; esta forma permite que sea mecánicamente relevante

sólo desde determinada elongación, antes de la cual es sólo importante la elastina. (48, 49, 50, 37) Este tipo de diferencias ha sido observada por investigadores como Brüel (51), Gentleman (48), Gundiah (34), Lanir (36), Lee (52) ó Vesely (49), pero generalmente si observa el componente por separado (ya sea colágeno o elastina) y no se considera el comportamiento de la pared con o sin los mismos. Es apropiado entonces, evaluar las propiedades del tejido sin algunos componentes a la vez, lo cual indicaría cuantitativamente el efecto del colágeno y la elastina sobre las propiedades mecánicas de la pared, y por ende una valoración de la relación entre ambos componentes según el vaso evaluado. Considerando lo anterior es posible entonces afirmar que la relación colágeno-elastina determina la geometría, función y propiedades elástico-mecánicas de cualquier vaso en el cuerpo, por lo cual entender el valor y comportamiento de esta relación permitiría construir un modelo característico generalizado de todo el sistema cardiovascular.

El punto crítico de comparación entre modelos es cómo se considera el comportamiento del colágeno y de la elastina. A partir de todas las consideraciones experimentales y teóricas planteadas se ha decidido enfocar el presente estudio de la siguiente manera:

- Ensayos de Tensión TU, TB, TC para muestras hidratadas de tejido y de SIS.
- Modelo SEF considerando el componente de elastina como anisotrópico y el componente de colágeno como anisotrópico y posiblemente dependiente de la elastina.
- Uso de los resultados histológicos para plantear la cantidad, por área, de la relación colágeno-elastina.

Suposiciones considerables:

- Considerar mínimo el efecto por MLV en los tejidos.
- Considerar mínimo el efecto sobre las propiedades mecánicas de elementos secundarios como sustancia base y proteoglicanos).
- Considerar la pared vascular como una sola capa uniforme.

Como método alternativo para los vasos de diámetro menor a 4mm, dadas las restricciones de área necesarias para la máquina biaxial, se utilizaría un protocolo de presión-volumen. Este último consta de la variación controlada de la presión interna del

vaso para observar deformaciones de su pared, siendo una aproximación más real al comportamiento del material al conservar su geometría tubular natural (53). La muestra es colocada en un circuito de fluido donde es transiluminada para medir la variación de los diámetros interno y externo a medida que se varía la presión interna. Los resultados obtenidos son relaciones de presión-volumen que son convertidas a relaciones de esfuerzo-deformación, por lo que es una prueba válida para comparación con resultados de tejidos biológicos tomados por ensayos de tensión.

#### *Estudio de la estructura de la matriz extracelular*

Se han realizado estudios con el fin de identificar factores que pueden usarse para predecir con confiabilidad el éxito al implantar un injerto vascular, como el diámetro interno inicial del injerto (54), técnica quirúrgica (16,54), bioactividad y resistencia mecánica (22). De manera similar, la porosidad ha sido identificada como factor importante de los biomateriales en muchas aplicaciones, dada la necesidad de crecimiento celular dentro del material (55) y la importancia de las limitaciones espaciales en el soporte de matriz extracelular para la orientación celular (56) Se ha encontrado que diferentes tipos de células migran preferencialmente a poros de diferentes diámetros (57).

#### *Análisis basado en imágenes*

En general, se puede realizar un análisis basado en imágenes para caracterizar la micro estructura tridimensional de los materiales. Se han realizado anteriormente estudios en los que la topología de la red que conforman las fibras en soportes fibrosos para regeneración de tejido vascular se ha caracterizado a partir de algoritmos de análisis de imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido (MEB) (58); asimismo, se ha cuantificado la población celular en injertos vasculares elaborados por medio de técnicas de ingeniería de tejidos usando análisis basado en imágenes y microscopía óptica o MEB (19); adicionalmente, se han simulado los esfuerzos cortantes inducidos por el flujo con modelos computacionales usando tomografía micro-computarizada y MEB (59).

### *Análisis del estado de esfuerzos*

Dadas las características microestructurales de la red existente en un soporte de matriz extracelular, la modelación de la MEC como una cercha se contempla como una forma de derivar su estado de esfuerzos bajo la aplicación de un cierto estado de cargas, en el caso de un injerto vascular, la carga generada por la presión vascular fisiológica. El método de rigidez para análisis de cerchas es una manera conveniente de analizar estructuras de este tipo, el cual se rige sobre los principios del análisis por elementos finitos, donde en este caso los elementos finitos corresponden a los elementos elásticos que componen la red o cercha y los nodos representan las intersecciones (60). El método de rigidez proporciona un estado de cargas externas e internas en la cercha o matriz, que por medio de un sencillo cambio de unidades teniendo en cuenta el diámetro de los miembros elásticos, puede ser transformado en un estado de esfuerzos externos e internos de la matriz.

### *Resultados previos del grupo de ingeniería biomédica (GIB)*

El GIB se formó a finales del año 1960, con el ideal de estudiar la aplicación de las herramientas de análisis de la ingeniería en la solución de problemas biológicos y médicos. Su director actual es Juan Carlos Briceño Triana. El GIB tiene amplia experiencia en el estudio, modelación y desarrollo de dispositivos para el tratamiento de patologías cardiovasculares como defectos cardiacos congénitos y la enfermedad aterosclerótica, para lo cual ha trabajado en proyectos que incluyen el desarrollo y evaluación *in vitro* e *in vivo* de parches de pericardio bovino, desarrollo de injertos vasculares, desarrollo de modelos quirúrgicos de la conexión total cavopulmonar, análisis mecánico y reconstrucción tridimensional de la estenosis de la arteria carótida y desarrollo de dispositivos oclusores para la corrección de malformaciones cardiovasculares, lo que ha producido publicaciones en revistas indexadas, una patente de modelo de utilidad concedida, dos solicitudes nacionales de patente de invención y una solicitud de patente de invención PCT.

Dentro de la línea de investigación en ingeniería de tejidos, el GIB anteriormente evaluó el desempeño de injertos vasculares de matriz extracelular obtenida a partir de la submucosa intestinal porcina en modelos de arteria carótida bovina y porcina en

crecimiento. El modelo bovino arrojó como resultado una tasa de permeabilidad de 5/12 y el modelo porcino una tasa de 0/8. Los injertos que permanecieron permeables en el modelo bovino fueron colonizados por las células del vaso adyacente al injerto, donde promovieron la regeneración de una arteria cuya pared vascular estaba compuesta por túnicas íntima, media y adventicia. Asimismo se evidenció presencia de células endoteliales en el lumen de los vasos regenerados (pruebas de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CD34).

Dados los buenos resultados observados en los injertos regenerados, la motivación para utilizar matriz extracelular se mantiene. El modelo porcino permitió observar que estrategias como: 1) inmovilización de heparina en el lumen del injerto, 2) administración de terapia posoperatoria anticoagulante y 3) evaluación de los injertos en un modelo con bajo metabolismo de calcio, fueron ineficaces para mejorar la tasa de permeabilidad (resultados sin publicar). De otra parte, en la literatura se intuye que la microestructura del material tiene una fuerte influencia en la respuesta del hospedero al injerto, pudiéndose desencadenar una respuesta inflamatoria de remodelación del tejido o por el contrario una reacción de cuerpo extraño (6, 58).

Por consiguiente, se hace evidente la necesidad de refinar el diseño de la microestructura del material teniendo en cuenta que las respuestas celulares se verán afectadas por la geometría de la matriz extracelular como una red porosa y las cargas y esfuerzos que ésta genere sobre las células. El diseño de un injerto que provea un resultado favorable en su evaluación en un modelo animal haría más viable un posible uso en humanos de estos injertos, para el tratamiento de enfermedades como aneurismas aórticos abdominales, bypass vascular periférico e insuficiencia renal (cuando el tratamiento incluye el uso de accesos vasculares).

Se plantea la siguiente **hipótesis** de trabajo: se considera que la combinación de parámetros (PH) presenta mejor tasa de permeabilidad

## Objetivos

### *Objetivo general*

Desarrollar y evaluar a nivel preclínico un método de obtención de matriz extracelular y manufactura de injertos vasculares que provea resultados eficaces y predecibles en el tratamiento de enfermedades que requieren el reemplazo de vasos sanguíneos.

### *Objetivos secundarios*

1. Estudiar las diferencias microestructurales inducidas por las combinaciones de dos factores dentro del método de obtención y manufactura de un injerto vascular de matriz extracelular: a) presencia de una capa densa de colágeno en el lumen del injerto vascular y b) estado de hidratación.
2. Evaluar en un modelo animal de vaso con alto flujo sanguíneo los resultados de permeabilidad y reconstrucción del tejido vascular obtenidos después de una semana con las combinaciones de los factores enunciados en el objetivo específico 1 y determinar la combinación de factores más favorable para la obtención de un injerto vascular con alta tasa de permeabilidad, según resultados de la respuesta inicial del hospedero en la vía inflamatoria de cicatrización o en la vía anti-inflamatoria de remodelación.
3. Evaluar en un modelo de vaso central con alto flujo sanguíneo los resultados de permeabilidad y reconstrucción del tejido vascular obtenido después de 20 semanas con un injerto vascular manufacturado según la combinación de factores encontrada como más favorable en el objetivo específico 2.
4. Evaluar en un modelo de vaso periférico de acceso vascular para el tratamiento de hemodiálisis los resultados de permeabilidad y reconstrucción del tejido vascular obtenido después de 4 y 20 semanas con un injerto vascular

manufacturado según la combinación de factores encontrada como más favorable en el objetivo específico 2.

## **Metodología**

Para cumplir el objetivo general y los objetivos específicos, se realizó en primer lugar una caracterización de la microestructura del material obtenido por medio de las combinaciones de dos factores diferentes de obtención de la matriz extracelular y manufactura del injerto. Estas combinaciones fueron evaluadas en un modelo preclínico en el que se midieron propiedades mecánicas, histológicas e inmunológicas, con el fin de determinar la combinación más favorable y contribuir al conocimiento en el campo desde el punto de vista de las características de una microestructura que presente una mejor respuesta del hospedero en términos de regeneración y permeabilidad.

El diseño experimental del proyecto en cuanto a los modelos preclínicos comprende tres fases: I) Evaluación microestructural para la refinación del método de obtención de la matriz extracelular y manufactura de los injertos; II) Evaluación del funcionamiento en vasos centrales; y III) Evaluación del funcionamiento como fístulas para tratamiento de hemodiálisis. El estudio se hará en un total de 22 porcinos (raza Yorkshire, 25kg) y ocho ovinos (raza Camuro, 40-45 kg) divididos en 4 grupos, como se describe a continuación.

### *Fase I: regeneración y permeabilidad*

Evaluación Microestructura (Modelo Animal: porcino)

Grupo 1: Injertos SIS propuestos (Lista 1, arteria carótida izquierda y derecha)

Número de sujetos: 8

Número total de injertos SIS implantados: 16

Para lograr una potencia del 70% se planteó un estudio con un diseño factorial de  $2^2$  con un número N igual a 8

*Crterios de inclusión*

Porcinos con las siguientes características:

Raza Yorkshire

Peso de  $40 \pm 5$  kgs

*Crterios de exclusión*

Síntomas gripales

A continuación se detallan los diseños experimentales definidos para cumplir cada uno de los objetivos específicos y los protocolos quirúrgicos, postquirúrgicos y de caracterización mecánica, histológica e inmunológica.

*Diseño experimental para el objetivo 1: estudio de las diferencias microestructurales inducidas por el método de manufactura*

Se estudiaron los efectos de combinar dos factores variables dentro del método de obtención y manufactura de un injerto vascular de matriz extracelular:

- a) presencia de una capa densa de colágeno en el lumen del injerto vascular y
- b) estado de hidratación.

Los injertos se obtuvieron usando el procedimiento desarrollado por el GIB y el procedimiento desarrollado y publicado por Badylak et al. (24). La combinación de los dos factores en el método de manufactura arroja cuatro tipos de injerto a evaluar:

Lista 1.

- A. SIS deshidratada, sin la capa stratum compactum del intestino delgado (RD).
- B. SIS deshidratada, con la capa stratum compactum del intestino delgado (PD).
- C. SIS hidratada, sin la capa stratum compactum del intestino delgado (RH).
- D. SIS hidratada, con la capa stratum compactum del intestino delgado (PH).

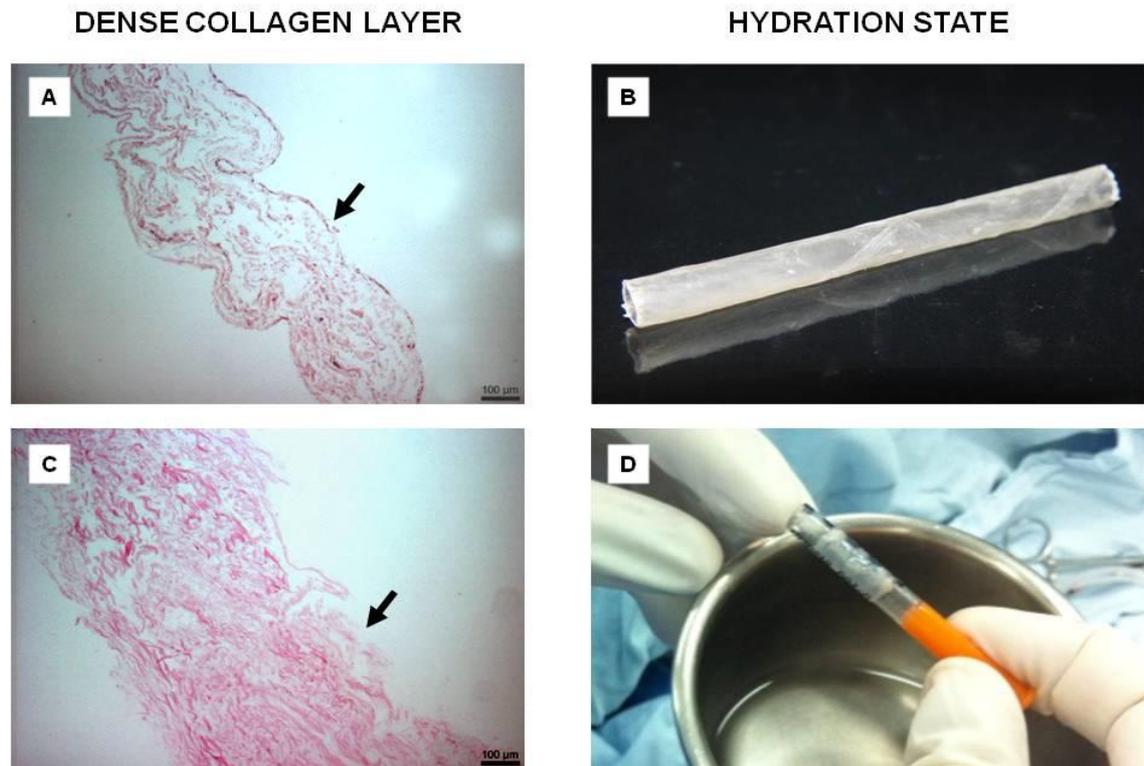


Figura 1: Injertos vasculares SIS obtenidos mediante la variación de dos parámetros de fabricación. Izq: microfotografía de injerto SIS en donde la capa densa de colágeno del lumen y el stratum compactum eran A) preservado y C) removido (10x HyE). Der: forma final de un injerto vascular en un estado deshidratado B) e hidratado D).

El estudio de los efectos de los métodos de manufactura se realizó a nivel tridimensional. Se previó que cada uno de los factores tendría un efecto en la microestructura de la matriz extracelular obtenida, en cuanto a densidad y tamaño de los espacios disponibles en la matriz que posteriormente soportaría las células del hospedero. Dicho estudio de la microestructura se realizó por medio de algoritmos de análisis de imágenes obtenidas con microscopio electrónico de barrido para hacer una reconstrucción del esqueleto de la estructura tridimensional de la red formada por la matriz extracelular y análisis de esfuerzos de dicho esqueleto tridimensional por medio del método de rigidez para análisis de cerchas. El análisis se realiza sobre el área mínima donde se encuentre un patrón repetible de la geometría y se utilizaron las cargas fisiológicas conocidas en la literatura para la arteria carótida en el análisis de esfuerzos.

### *Procedimiento de análisis microestructural basado en imágenes*

Para la caracterización de la microestructura se utilizó microscopía electrónica de barrido a 1500x y 3000x para adquirir imágenes en fase de los soportes a lo largo de todo el espesor de la muestra (n=6). Para adquirir estas imágenes las muestras fueron seccionadas a distintas distancias a partir de la superficie luminal con la ayuda de un micrótopo. Las imágenes fueron procesadas computacionalmente con un software in-house de análisis digital de imágenes elaborado en lenguaje Matlab (TheMathWorks, Natick, MA) para reconstruir la microestructura fibrilar de la SIS y medir los ángulos de orientación de las fibras. Una comparación de dichos ángulos permite determinar las variaciones estructurales que inducen los métodos de manufactura.

### *Procedimiento quirúrgico general*

Los animales a los que se les practicó cirugía estuvieron en ayuno por 24 horas y sin agua durante 12 horas, antes del procedimiento.

#### *1. Anestesia*

##### *1.1 Sedación*

Se administra por vía intramuscular (en la misma ampolla) en la cara externa del muslo xilacina (1 mg/kg) + atropina (0,04 mg/kg) + midazolam (0,5 mg/kg). Se ubica el animal en el guacal, se espera 5-10 minutos y posteriormente se pone en la mesa experimental.

##### *1.2 Acceso venoso*

Se procede a canalizar la vena yugular derecha con catéter venoso 18 gauge para la administración de la anestesia. Se conecta con una llave de tres vías el equipo de venoclisis y microgoteo conectado a un buretrol y bolsa de solución salina al 0.9%

previamente purgado. Se fija el catéter y se comprueba el paso libre de solución salina. Se colocan líquidos de mantenimiento a 10cc/kg/hora.

### 1.3 Monitorización y fijación

Se fija el animal en la mesa experimental, en decúbito supino en caso de implantación del injerto en arteria carótida o aorta abdominal o en decúbito lateral para implantación en arteria radial. Se ubica un oxímetro de pulso en una de las patas traseras o en la oreja y electrodos de derivaciones bipolares en las axilas y pelvis.

### 1.4 Ventilación:

- Preoxigenación: Se usa una máscara facial en el hocico con oxígeno a 10 L/min, durante 3 minutos.
- Posterior a la relajación se procede a intubación orotraqueal con un tubo número 5 o 6.
- Se verifica adecuada colocación del tubo y se conecta al ventilador.
- Si se presenta dificultad para la vía aérea, se ventila con presión positiva 20 veces por minuto sin sobrepasar los 20 mmHg.

### 1.5 Antibiótico profiláctico:

Se administra Cefazolina a una dosis de 20 mg/kg a través de vena periférica.

### 1.6 Mantenimiento anestesia:

Se mantiene principalmente con anestesia intravenosa con propofol 30 mg/kg/hr a través de una bomba de infusión.

### 1.7 Analgesia transoperatoria:

Se administra Tramadol a una dosis de 0,5 mg/kg diluido en el buretrol.

## 2. *Procedimiento quirúrgico*

### 2.1 Preparación sitio quirúrgico:

Se realiza desinfección del sitio operatorio y colocación de campos estériles.

### 2.2 Abordaje:

Infiltración local de xilocaina al 1% sin epinefrina. Se realiza una incisión longitudinal de aproximadamente 5 cm. Se identifican y disecan las arterias de interés (arterias carótidas).

### 2.3 Implante del injerto:

Se identifican las arterias para implantar el injerto de SIS y hacer los procedimientos de control. Se realiza una anastomosis término-terminal con Prolene vascular 7-0 y se verifica la permeabilidad del injerto. Se administra heparina a dosis 80U/kg por vena periférica segundos antes de implantar los injertos.

### 2.4 Finalización:

Se procede a realizar cierre de incisión y colocación de vendaje sobre la herida. El animal se deja en recuperación por una hora.

## 3. *Cuidado postoperatorio*

Una vez terminada la instrumentación, se suspende la administración de anestésico intravenoso. Se mantiene con oxígeno suplementario con máscara facial hasta recuperación de estado de conciencia del animal.

Se administran 100mg de aspirina al día y 1.5mg/kg de enoxaparina una vez al día durante el tiempo de observación predeterminado para cada objetivo del trabajo.

#### 4. *Valoración postquirúrgica de la permeabilidad del injerto*

Uno, dos, tres y siete días después de la implantación se evalúa la permeabilidad del injerto mediante Doppler vascular. Para esta evaluación se seda el animal administrando 1 mg/kg de xilacina + 0.044 mg/kg de atropina + 0.5 mg/kg de mídasela intramuscular en la cara externa del muslo. Se identifican los injertos a una profundidad de 4 mm.

Semanalmente se realiza un Doppler vascular para evaluar tasa de permeabilidad, formación de estenosis, formación de pseudoaneurismas, permanencia de la fístula y comportamiento hemodinámico en todos los grupos (para los objetivos con observación mayor a una semana).

#### 5. *Eutanasia*

El procedimiento lo realiza un médico veterinario. El animal se lleva a la sala de experimentación, en donde se administra inicialmente midazolam (0.5 mg/kg) y 5 minutos después solución inyectable de pentobarbital sódico y difenilhidantoína sódica (IV) (1ml/5kg).

#### 6. *Procedimiento de toma de muestras*

El procedimiento se realiza después de la eutanasia del sujeto.

6.1. Se rasura el sitio quirúrgico.

6.2. Se realiza incisión, disección e identificación de la arteria.

6.3. Se extrae el injerto de SIS junto con segmentos de la arteria adyacente proximal y distal.

6.4. Se corta el injerto en dos partes en la dirección longitudinal, de manera que cada muestra contiene un segmento de injerto y las dos anastomosis.

6.5. Una de las muestras se almacena en solución salina al 0.9% a 4°C para el análisis mecánico.

6.6. La otra muestra se almacena en solución de formol al 10% para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico.

6.7. Se extrae el vaso de control (vaso nativo o injerto de ePTFE según el caso) junto con segmentos de la arteria adyacente proximal y distal y se almacena como se describió arriba para análisis mecánico, histopatológico e inmunohistoquímico.

#### *Protocolos de análisis mecánico*

Para determinar los esfuerzos sobre la pared de los diferentes vasos que se están trabajando (arterias, venas e injertos) se utilizan dos métodos experimentales: ensayos de tensión y de Presión-Volumen. El objetivo de ambas pruebas es determinar el comportamiento de la curva Esfuerzo-Deformación propia del material para obtener propiedades específicas que puedan utilizarse en la comparación entre vasos nativos e injertos (Módulos de elasticidad o de Young principalmente).

#### *7. Prueba de tension*

7.1. La prueba de tensión que se realiza consiste en someter un espécimen de tejido a una carga controlada hasta una deformación específica. Para esto, las muestras son transportadas hasta el laboratorio, donde se mantienen en neveras hasta el momento de los experimentos. Se considera que las propiedades mecánicas de las muestras son semejantes a las de los vasos en condiciones nativas solo en un período de hasta máximo dos días luego de su extracción.

7.2. Se limpian todos los vasos con el fin de retirar cualquier tipo de elementos no pertenecientes a la pared vascular (capas de grasa, tejido circundante, glándulas, coágulos, etc).

7.3. Se cortan muestras cuadradas de 15 x 15 mm considerando las direcciones longitudinal y circunferencial del vaso.

7.4. La muestra se monta en la máquina de ensayos biaxial Bose ElectroforcePlanar Biaxial Testbench (Eden Prairie, Minnesota), ubicada en el laboratorio de Dinámica Cardiovascular, U. Andes, utilizando un sistema de ganchos.

7.5. La muestra se somete a un protocolo de carga sinusoidal para aliviar esfuerzos y ordenar las fibras preliminarmente, seguido de una carga lineal logrando deformaciones entre 30 y 60%.

- 7.6. Los ensayos arrojan la carga requerida (N) para llegar a la elongación determinada (mm), con lo cual es posible determinar el esfuerzo (MPa) al cual está sometida la muestra, conociendo sus dimensiones iniciales, y la deformación resultante (mm/mm; %) que es determinada por seguimiento de puntos con video-extensómetro.
- 7.7. Se construye una curva de esfuerzo en la pared contra deformación.

## 8. *Prueba presión-volumen*

- 8.1. La prueba de presión-volumen que se realiza consiste en someter la muestra a una presión interna dada por una columna de agua controlada y medir la deformación que se observa en la pared, la cual es determinada al observar el cambio en el diámetro interno del vaso con transiluminación o con seguimiento de puntos con video-extensómetro.
- 8.2. La muestra se corta en la anastomosis para obtener una muestra de injerto y una muestra de vaso nativo. Ambas muestras se evalúan mecánicamente.
- 8.3. Se introducen dos soportes cilíndricos huecos en los extremos de la muestra y se aseguran con una abrazadera plástica, con el fin de estudiar el espécimen del vaso en su forma tubular natural.
- 8.4. Se posiciona una luz debajo de la muestra para contrastar la pared vascular.
- 8.5. Se introduce fluido progresivamente dentro de la muestra a través de uno de los soportes cilíndricos huecos, controlando la presión que ejerce el fluido que se introduce.
- 8.6. Se mide con la asistencia de un video-extensómetro digital el desplazamiento de la pared a medida que la presión ejercida dentro de la muestra aumenta.
- 8.7. Los ensayos arrojan una presión interna conocida (Pa) que estira radialmente el vaso hasta un diámetro interno específico (mm), con lo cual es posible determinar el esfuerzo (MPa) al cual está sometida la muestra, conociendo las columnas de agua, y la deformación resultante de la pared (mm/mm; %).
- 8.8. Se construye una curva de esfuerzo en la pared contra deformación a partir de un modelo matemático que relaciona la presión interna y el desplazamiento de la pared.
- 8.9. Se analiza en la curva los esfuerzos en la pared y deformaciones correspondientes al rango de presión fisiológica.

8.10. Se comparan estos resultados para las diferentes muestras.

#### *Evaluación histológica e inmunohistoquímica*

Los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos fueron realizados por una patóloga (JM), para valorar cualitativamente la regeneración de la pared vascular.

Se cortaron dos secciones de 6 micras de espesor de cada una de las muestras fijadas en formol. Cada sección corresponde a un corte longitudinal que incluye las paredes vasculares nativas y el injerto. Las muestras fueron evaluadas cuantitativa y cualitativamente por dos investigadores según los criterios al final de esta sección. La evaluación se realizó de manera ciega e independiente. Los valores de referencia para las mediciones cuantitativas fueron basados del trabajo de Badylak y colegas en caracterización de la remodelación reconstructiva de la SIS en un modelo de pared abdominal en rata [Brown, 2012]. Todas las mediciones se realizaron en tres áreas del injerto (proximal, media y distal) con una magnificación de 40x (n=6 mediciones por muestra, 4 muestras por grupo), a excepción de las mediciones de presencia de trombo oclusivo, que se realizaron inspeccionando la totalidad de la muestra. Los criterios principales se evaluaron de la siguiente manera:

- 1) La cuantificación de la endotelización del injerto se realizó mediante evaluación inmunohistoquímica con anticuerpo CD-31, midiendo el porcentaje de la superficie luminal del injerto cubierta por células endoteliales.
- 2) La cuantificación de la presencia de macrófagos del fenotipo perteneciente a la vía remodelatoria se hizo mediante evaluación inmunohistoquímica, con anticuerpo CCR7 para identificar macrófagos M1 y anticuerpo CD206 para macrófagos M2. Se realizó conteo de los macrófagos M1 y M2 y se calculó la relación M2:M1 (número de células CD206+ dividido el número de células CCR7+). El conteo de los macrófagos M0 (sin diferenciar) se realizó con anticuerpo CD68 y se utilizó para estudiar si hay correlación de la relación M2:M0 con el puntaje calculado con los criterios cuantitativos.
- 3) La cuantificación de la permeabilidad se hizo mediante la inspección de las muestras para determinar la presencia o ausencia de un trombo oclusivo. Para ello se realizó evaluación histológica con tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico-elástica,

midiendo el porcentaje de la superficie luminal del injerto cubierta por un trombo y el tamaño del trombo (% de la longitud mayor del trombo en dirección perpendicular al lumen, con respecto al diámetro del injerto en el momento de la implantación).

La evaluación cualitativa y cuantitativa de la infiltración celular, el número de células gigantes multinucleadas, la vascularidad, encapsulación y degradación del injerto se realizó histológicamente con tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico-elástica.

#### *Variables a evaluar*

Endotelización (% de superficie cubierta por células endoteliales):

- 0: 0-25%
- 1: 26-50%
- 2: 51-75%
- 3: 76-100%

Macrófagos M2 (células CD206+ en un campo de 40x)

- 0: 0-9
- 1: 10-19
- 2: 20-29
- 3: 29<

M2:M1

- 0: 0-0.25
- 1: 0.26-0.50
- 2: 0.51-0.75
- 3: 0.75<

Trombo oclusivo sobre de la superficie luminal

- 0: 100%
- 1: 50%
- 2: 5%
- 3: 0%

**Infiltración celular**

0: 0

1: 1-75

2: 76-150

3: 150&lt;

**Células gigantes multinucleadas**

0: 5&lt;

1: 2-5

2: 1

3: 0

**Vascularidad**

0: 0-1

1: 2-5

2: 6-10

3: 10&lt;

**Degradación**

0: Ninguna

1: Parcial

2: Media

3: Total

*Cuantificación de la regeneración*

Los resultados de regeneración fueron cuantificados por un investigador ciego, utilizando el método de puntuación en donde el resultado para cada criterio fue clasificado de acuerdo a lo que se muestra en la Tabla 1, una puntuación baja indicaba una inclinación hacia una vía de cicatrización, mientras que un puntaje alto indicaba una respuesta hacia una vía regenerativa, los criterios mostrados en la tabla evaluaron

trombogenicidad, respuesta inflamatoria, vascularización y población de fibroblastos en los injertos. Las observaciones fueron realizadas en un campo de amplificación 40X (anastomosis proximal, porción media y anastomosis distal del injerto). Los fenotipos de los macrófagos fueron evaluados con el número CCR7+ y CD206+ en los mismos campos 40X.

Table 1: Regeneration scoring criteria.

	1	2	3	4
Thrombus - diameter	100-85%	84-20%	19-6%	5-0%
Thrombus - length	100-85%	84-20%	19-6%	5-0%
Mononuclear cells	150<	76-150	1-75	0
Polymorphonuclear cells	150<	76-150	1-75	0
Multinucleated giant cells	>5	2-5	1	0
Vascularity	0-1	2-5	6-10	10<
Fibroblasts	0	1-75	76-150	150<

Tabla 1: variables de regeneración (criterios de medición)

#### *Disminución de sesgos*

Los sesgos fueron disminuidos en dos momentos específicos durante el desarrollo del estudio: 1) el cirujano no escogía el tipo de injerto a implantar y 2) el estudio histopatológico fue realizado por una patóloga, la cual se encontraba completamente ciega con respecto a qué tipo de injerto estaba evaluando

#### *Análisis estadístico*

Las diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos de estudio fueron determinadas por medio de dos vías, ANOVA tukey ( $p < 0.05$ ), las diferencias entre parámetros (P vs. R y H vs. D) fueron analizadas con la T de student. Todos los análisis fueron realizados en GraphPad Prism 6.

#### *Aspectos Éticos*

Este estudio fue revisado y aprobado por el comité de ética de la Fundación Cardioinfantil - Instituto de cardiología, según consta en el acta 47 del 10 de abril de 2012. (Se adjunta copia de la aprobación en el anexo 1).

## Resultados

### *Permeabilidad y aspecto macroscópico*

La evaluación del flujo a través de las muestras explantadas indicó tasas de permeabilidad de 100% (4/4) para los injertos PD, 100% (4/4) para los injertos de RD, 50% (2/4) para los injertos de PH y el 75% (3/4) para injertos de RH. Los injertos permeables tenían unas zonas blancas relucientes distribuidas por todo el lumen lo que sugiere el desarrollo continuo de una pared vascular (Fig. 2, PD, RD y RH). En los Especímenes ocluidos se encontraron trombos oscuros y rígidos principalmente en las anastomosis distales (Fig. 2, PH).

Los injertos del grupo PD mantuvieron su forma tubular, sin embargo, eran rígidos y frágiles a su vez. Un espécimen tenía un trombo laminar no oclusivo cercano a la anastomosis y a través de toda la longitud del injerto. Las muestras RD tenían aspecto tisular y un espécimen tenía algunas áreas rosadas sugestivas del desarrollo de una capa muscular. Una muestra tenía un trombo laminar y dos muestras tenían una pequeña cantidad de puntos blancos sugestivos de depósitos de calcio. Dos especímenes tenían algún grado de estenosis en las anastomosis distales. Los dos injertos PH tenían algún grado de estenosis y uno de los especímenes ocluidos estaba rodeado de un exudado inflamatorio. Evidencia de la oclusión se encuentra en la Figura 2, donde un trombo fue encontrado en la arteria carótida distal.

Uno de los injertos permeables RH tenía algún grado de estenosis causado por la presencia de un trombo laminar en el lumen. Otro injerto permeable RH tenía puntos blancos sugestivos de depósitos de calcio.

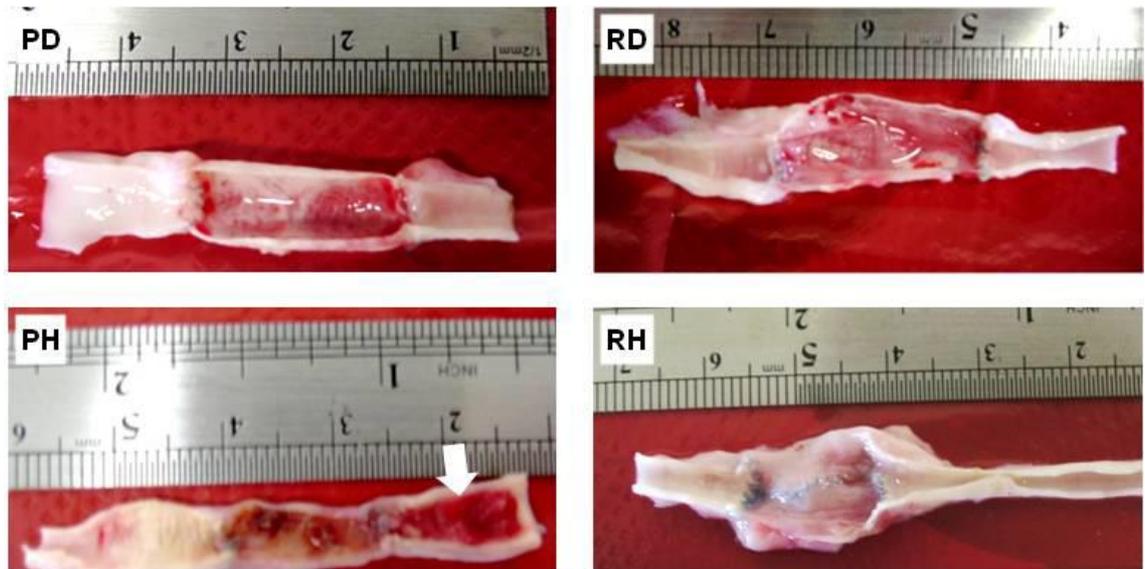


Figura 2: Imágenes representativas de los injertos SIS después de siete días de implante en la Arteria Carótida Externa de un porcino. Los especímenes incluyen los vasos adyacentes y el injerto entre las líneas de sutura. Nótese la presencia de áreas blancas y brillantes sugestivas de la presencia de un lumen. El injerto PH es un ejemplo de un injerto ocluido donde la Arteria Carótida distal estaba completamente trombosada (flecha blanca).

#### *Valoración histológica*

Imágenes histológicas representativas se muestran en la figura 3, y su puntaje histológico en la figura 4. La respuesta del huésped comprende una infiltración generalizada de células inflamatorias y fibroblastos además de crecimiento tisular en la periferia del lumen en los injertos.

Un trombo laminar compuesto por una red de fibrina y en algunas oportunidades con atrapamiento de glóbulos rojos fueron encontrados cubriendo la superficie del lumen en una gran proporción de especímenes (flecha negra en las imágenes HE y MT en la figura 3), cuantificado con los criterios de longitud del trombo (~2). Sin embargo los diámetros de los trombos no indicaron un carácter oclusivo, especialmente en el grupo PD, el cual presentó el mejor resultado en trombogénesis.

En general, todos los diseños recibieron un puntaje alto en respuesta inflamatoria (~3). Se observaron monocitos dentro de los injertos RD, PH y RH y en el tejido circundante del injerto PD (flecha blanca fig. 3). Hubo un mejor resultado en los injertos PD para polimorfonucleares los cuales se encontraron cercanos a las anastomosis distales. Algunas células gigantes fueron observadas (7 en total, 5 en un RD y 2 en un RH).

De acuerdo a la fragilidad y rigidez detectada en el examen macroscópico de los especímenes PD, sus puntajes para vascularización y población de fibroblastos fueron bajas (~1), incluso muy poca infiltración celular fue observada en estas estructuras (HE en Fig. 3), la vascularización más baja fue observada en el grupo PD (flecha negra en Fig. 3), mayor en RD y PH (~2), y la más alta en el grupo RH (~3), la población de fibroblastos fue más baja en PD, mientras que en el resto de los grupos fue de ~3 (flecha blanca en Fig. 3), además algunos fibroblastos fueron observados en una muestra RD como la apariencia macroscópica lo sugería.

Los puntos que semejaban depósitos de calcio que fueron observados macroscópicamente se corroboraron en el estudio histológico, sin embargo, la calcificación no parece ser un problema en los injertos después de siete días de implante. Un período más largo de implantación puede aclarar el papel de la calcificación en los injertos SIS.

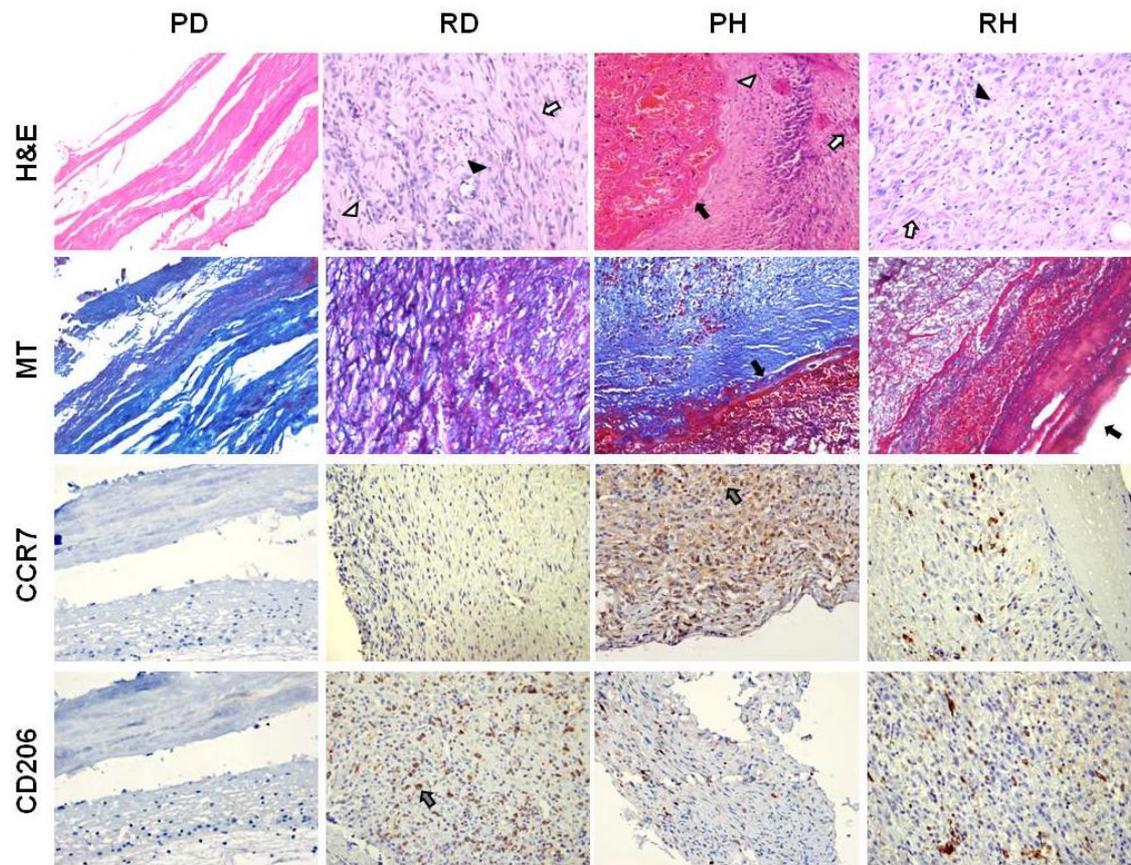


Figura 3: imágenes representativas de muestras de cada grupo con Hematoxilina-Eosina (HE), Tricromo de Masson (MT), anticuerpo CCR7 y CD206. PD con pocas estructuras celulares. Redes laminares de fibrina (no oclusivas) fueron observadas en la superficie de algunos injertos (HE, MT. flechas negras). Vascularización fue observada en todos los injertos excepto en PD, y en gran abundancia en los injertos PH (HE. Flechas negras) Fueron encontrados fibroblastos en todos los injertos excepto en PD (HE. Flechas blancas) Macrófagos (CCR7) del fenotipo M-1 fueron observados en mayor proporción en los injertos PH, mientras que los M-2 (CD-206+) fueron mayormente observados en los injertos RD (Flechas grises). Todas las imágenes son con magnificación 40X, Bar:10 $\mu$ m.

#### *Valoración inmunohistoquímica*

Imágenes representativas son mostradas en la Figura 3 (flechas grises) y los resultados cuantitativos son mostrados en la figura 5. Los injertos PH tuvieron el mayor recuento de macrófagos CCR7+, fenotipo M-1; mientras que los injertos PD tuvieron el menor

conteo. Los macrófagos M-1 fueron encontrados en similar cantidad en los injertos RD y RH. El mayor recuento de macrófagos (CD206+) fenotipo M-2 fue encontrado en los injertos de tipo PD. Los injertos hidratados (PH y RH) tuvieron un recuento similar de macrófagos M-2. Los injertos PD, RD y RH tuvieron un recuento mayor de macrófagos CD206+ que los del fenotipo CCR7, siendo estos últimos mayor en el grupo PH. El peso de las células CD206+, a diferencia de las CCR7+ indicaba que el grupo PD tenía una pequeña cantidad de infiltrados (ambos en los fenotipos M-1 y M2). El grupo RD presentó la mayor respuesta regenerativa, y el grupo PH una mayor respuesta de cicatrización.

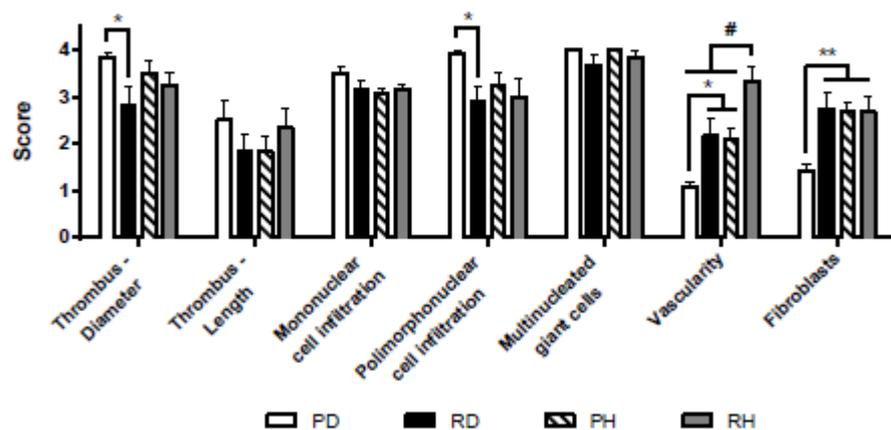


Figura 4: Puntuación histológica de acuerdo a los criterios expuestos en la tabla 1. Los injertos PD tuvieron una puntuación significativamente más alta en cuanto a reacción inflamatoria y trombogenicidad en comparación con los injertos RD, pero menor conteo de fibroblastos y vascularización en comparación con los otros grupos. Los injertos PD tuvieron el menor puntaje en vascularización y el grupo RH el mayor. El conteo de fibroblastos fue similar en RD, PH y RH.  $p < 0.05$ ; #:  $p < 0.0001$  vs PD,  $p < 0.05$  vs RD,  $p < 0.01$  vs RH.

## Discusión

En éste estudio se exploró el efecto de la modificación de dos parámetros en la fabricación de dos injertos SIS, en la tasa de permeabilidad y en la temprana regeneración del tejido vascular. Variamos el estado de hidratación del injerto mediante deshidratación o hidratación del mismo y en la preservación o remoción de una capa (estratum compactum) del intestino delgado.

En general, encontramos que la presencia de una importante infiltración celular en los injertos y el crecimiento de tejido en superficie eran evidencia de la cualidad de los injertos SIS en estimular la regeneración del tejido vascular. Sin embargo importantes diferencias entre los grupos fueron encontradas.

La tasa de permeabilidad era mayor en los injertos deshidratados (8/8, 100%) que en los hidratados (5/8, 63%), lo que sugiere que el hecho de deshidratar los injertos SIS mejora la permeabilidad. Otros estudios solo han explorado la permeabilidad con injertos hidratados siendo ésta en los primeros ocho días de 24/28 (86%) (24). Nuestro estudio provee nueva información en la estrategia para lograr mejores tasas de permeabilidad en el corto plazo mediante deshidratación de los SIS. Por otra parte la variación de P/R produjo unas tasas de permeabilidad de 6/8 (75%) para los injertos P vs. 7/8 (88%) para los injertos R.

Lantz y colaboradores encontraron que la presencia de una capa luminal de colágeno denso provee una permeabilidad superior de 8/8 vs. 1/8 a 6 semanas de implantación (25), de la misma manera que Huynh y colaboradores tuvieron a las cuatro semanas de implantación con permeabilidad de 9/9 en los injertos con depósito de una capa densa de colágeno (30). Dado que nosotros obtuvimos una mayor permeabilidad en los injertos R que en los P, y retomando los resultados de H vs. D, consideramos que la interacción de los dos parámetros de fabricación sugieren un papel importante en la permeabilidad.

La evolución histológica e inmunohistoquímica proporciono información importante en cuanto a los resultados en regeneración. El aumento de tres veces en la adhesión de las células micro vasculares endoteliales en los injertos hidratados sobre los deshidratados reportado, por el grupo de Badyalk 1999 , fue complementado por nosotros con y sin preservación del estratum compactum. Entre las estructuras que deben adherirse al injerto para lograr una remodelación de la pared vascular, la vascularización y la población de fibroblastos son elementos muy importantes en la medida que la angiogénesis provee de nutrientes y oxígeno a los tejidos en desarrollo. Análisis hechos con la T de student indicaron que los injertos R tenían una mayor infiltración de fibroblastos y vascularización (p: 0.0319 y p: 0.0007 respectivamente) que los injertos P, mientras que, los injertos H tenían mucha mayor vascularización que los injertos D (p: 0.0015).

Sin embargo, parece que las diferencias en adhesión celular fueron en su mayoría debidas a la interacción entre los dos niveles de los parámetros en PD (estratum compactum preservado y deshidratación) más que la sola presencia de estratum compactum, teniendo en cuenta que los injertos PH tuvieron el mayor índice de vascularización y una infiltración de fibroblastos similar a los injertos RH. Incluso se encontró que la interacción fue significativa en la puntuación histológica ( $p < 0.0001$ ). Además, estos resultados indicaron que la adhesión micro vascular del endotelio fue mayor en los injertos H, no necesariamente se puede extrapolar a un aumento en la adhesión de otros tipos celulares como por ejemplo los fibroblastos. Fuimos capaces de comparar dicho aumento de la adhesión con nuestros resultados en el fenotipo de los macrófagos, donde un mayor número de células CCR7+ (fenotipo M1) fue encontrado en los injertos H (p: 0.0120). Esto ilustra cómo, a pesar que la adherencia está intuitivamente relacionada a una más amplia cantidad de estructuras celulares poblando el material del injerto, la adhesión de estructuras y fenotipos celulares que pueden desencadenar los mecanismos de cicatrización también se podrían mejorar por el aumento de la adhesión observada en el material SIS hidratado.

La fragilidad y la rigidez encontradas en el examen macroscópico de los injertos PD fueron evidenciadas también en la histología, fenotipo de macrófago y en el estudio mecánico. A pesar que estos injertos presentaran una permeabilidad del 100%, la deficiente vascularización e infiltración de fibroblastos, así como la rigidez del tejido en

comparación con los otros injertos durante los primeros siete días de implante fueron una preocupación con respecto al proceso de regeneración desencadenado por este injerto y que no sea una opción óptima para la regeneración del tejido vascular.

Puede ser posible que con tiempos más largos de implante mejore la regeneración. El ratio M2/M1, indicó que a pesar que el número de células en los injertos PD fue entre 2 y 3 veces menos que en los otros injertos, la población de macrófagos M2 fue aproximadamente 5 veces mayor que la de M1. Esto puede anticipar que una mayor presencia de macrófagos de fenotipo M2 pueda desencadenar un proceso regenerativo en estadios más tardíos después del implante. Sin embargo nuestro estudio provee evidencia que en una respuesta temprana, la regeneración fue más lenta e inferior en los injertos PD.

Los injertos RD y RH mostraron una más rápida y efectiva regeneración. Los injertos RD tuvieron una permeabilidad del 100%, algunos trombos laminares, leve reacción inflamatoria, una razonable vascularización, buena infiltración de fibroblastos, el mayor recuento de macrófagos M2 (el doble de PH y RH, y 3 veces mayor que el PD), y el mejor ratio M2-M1 (~7). También presentó la más drástica transición mecánica sugiriendo que éste injerto presentó el mejor resultado y balance entre permeabilidad y regeneración. Por otro lado, los injertos RH tuvieron una permeabilidad del 75%, la mejor vascularización, buena infiltración de fibroblastos y un ratio M2/M1 alrededor de 2, sugiriendo que un período de implante más largo puede proveer mayor información acerca de si la pared vascular puede regenerarse satisfactoriamente en los injertos RH. En perspectiva, aunque los resultados con los injertos RH fueron promisorios, éstos fueron inferiores a los obtenidos por los injertos RD en cuanto a permeabilidad, ratio M2/M1, y población de macrófagos M2.

Los injertos PH tuvieron los resultados menos favorables dentro del estudio. A pesar de que la vascularización y la infiltración de fibroblastos fueron similares a la de los injertos RD, su permeabilidad fue del 50%, mayor recuento de macrófagos M1 y un ratio M2/M1 por debajo de 1. Estos resultados anticipan una consecuente formación de tejido cicatricial. Todo esto eleva dudas en si éste tipo de injertos pueden ser una opción recomendable para el uso en vasos de pequeño diámetro.

La inflamación, estudiada desde el punto de vista del fenotipo del macrófago, indica que la respuesta del huésped fue predominantemente adversa en los injertos PH y altamente beneficiosa en los injertos RD, la variación P/R no mostró ningún efecto evidente en el fenotipo de los macrófagos, mientras que la variación H/D sí afectó los resultados. La hidratación en los injertos P aumentó el recuento de M1 manteniendo el conteo de M2. El ratio M2/M1 se vio fuertemente afectado por el estado de hidratación, donde el ratio de macrófagos M2 fue 2 a 6 veces mayor en los injertos D que en los H. Planteamos entonces la hipótesis en que las alteraciones micro estructurales causadas por la compresión de las fibras de colágeno durante la deshidratación pudo haber cambiado las señales mecánicas traducidas por el injerto a favor de la diferenciación de los monocitos al fenotipo M2. Los resultados aquí obtenidos indican que la deshidratación de los injertos, además de potenciar el aumento en la permeabilidad también propicia las vías de regeneración por parte del huésped.

Hubo ciertas limitaciones en el presente estudio. Solo dos parámetros de fabricación fueron evaluados, sin embargo, múltiples variables en las técnicas para descelularización y conformación de una forma cilíndrica pueden tener similar impacto en la permeabilidad y regeneración.

### **Recomendaciones**

El impacto de los métodos utilizados para la descelularización para preservar o remover el estratum compactum debe ser estudiado en mayor detalle, específicamente en el entrecruzamiento de fibras de colágeno y el lavado de células de crecimiento presentes naturalmente en los injertos SIS. Igualmente solo evaluamos y comparamos la respuesta temprana de los injertos. Estudios a mediano y largo plazo deben ser realizados para validar nuestros resultados en pro de evaluar la utilidad de estos injertos para el reemplazo y regeneración de vasos de pequeño calibre.

### **Conclusiones**

Nuestros resultados indican que los dos parámetros de fabricación estudiados, 1) hidratado o deshidratado, y 2) presencia o remoción de la capa estratum compactum, afectan drásticamente la tasa de permeabilidad y regeneración en los injertos vasculares SIS. Entre todos, los injertos RD produjeron el mejor resultado en términos de permeabilidad, regeneración, perfil de macrófago y mecánica. Este trabajo es una contribución para entender cómo mejorar la regeneración de tejidos con los injertos SIS.

## Anexo 1



CEIC-173-2012

Bogotá, 16 de mayo de 2012

Doctor  
**JUAN CARLOS BRICEÑO**  
Investigador principal  
**FUNDACIÓN CARDIO INFANTIL – IC**  
Bogotá, D.C.

*Ref: "Uso de la matriz extracelular como material para ingeniería de tejidos - desarrollo de soportes para el reparo y reconstrucción de vasos sanguíneos"*

Estimado doctor Briceño:

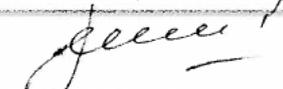
Para constancia certificamos que su trabajo en referencia fue revisado y **APROBADO** para su realización en la Fundación Cardioinfantil – Instituto de Cardiología, en Comité de Ética en Investigación Animal, con fecha 14 de octubre del 2011 y con quórum decisorio.

Esta autorización se revalida en se sesión del 10 de abril del 2012 tal como figura en Acta No. 47. Según las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, resolución No. 8430 de 1993, de la Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico de la República de Colombia, Ministerio de Salud; la investigación es clasificada con riesgo mínimo.

Valga esta para recordarle, que la función de este Comité es la protección de los sujetos de la investigación y de los investigadores.

Atentamente,

---



**RODOLFO J. DENNIS VERANO, MD, MSc**  
Presidente (E) Ética en Animal

Jacqueline R.

## **Anexo 2**

### **Cronograma**

1. Propuesta y diseño del estudio: II semestre de 2011.  
Responsable: Diana Sanchez.
2. Adquisición de materiales: Enero de 2012.  
Responsable: Diana Sánchez y Javier Navarro.
3. Propuesta a Colciencias: Enero de 2012.  
Responsable: Juan C Briceño y colaboradores.
4. Diseño de injertos: Enero de 2012  
Responsable: Diana Sánchez y Javier Navarro.
5. Procedimientos quirúrgicos: Junio a Octubre de 2012.  
Responsable: Juan Camilo Araque.
6. Cuidado postquirúrgico: Junio a Octubre de 2012.  
Responsable: Sergio Gálvis.
7. Estudios postexplante: Enero a Mayo de 2012.  
Responsable Diana Sánchez y Javier Navarro.
8. Estudio histológico: Enero a Mayo de 2012.  
Responsable: Rocio López
9. Manuscrito y postulación: Mayo de 2013  
Responsable: Juan C Briceño y colaboradores.
10. Presentación ASAIO – American society for certification internal organ:  
Junio 2013  
Responsable Diana Sanchez.

**Anexo 3****Presupuesto**

<b>Experimentación animal</b>	<b>/por experimento</b>		<b>Total</b>
Sujeto	\$	280.000	\$ 2.240.000
Alojamiento y transporte	\$	140.000	\$ 1.120.000
Veterinario	\$	160.000	\$ 1.600.000
Disposición cuerpo	\$	-	\$ -
<b>Subtotal</b>	<b>\$</b>	<b>580.000</b>	<b>\$ 4.960.000</b>

<b>Insumos quirúrgicos</b>	<b>/por experimento</b>		<b>Total</b>
Medicamentos	\$	40.000	\$ 320.000
Suministros	\$	120.000	\$ 960.000
<b>Subtotal</b>	<b>\$</b>	<b>160.000</b>	<b>\$ 1.280.000</b>

<b>Histología e inmunohistoquímica</b>	<b>/por experimento</b>		<b>Total</b>
H&E	\$	-	\$ -
MT	\$	-	\$ -
CD31	\$	76.400	\$ 458.400
CD68	\$	76.400	\$ 458.400
CCR7 - anticuerpo	\$	61.084	\$ 977.340
CCR7 - estudio	\$	76.400	\$ 458.400
CD206 - anticuerpo	\$	46.540	\$ 744.640
CD206 - estudio	\$	76.400	\$ 458.400
<b>Subtotal</b>	<b>\$</b>	<b>260.424</b>	<b>\$ 3.555.580</b>

<b>Adquisición de imágenes</b>	<b>/por experimento</b>		<b>Total</b>
Preparación de muestras (cortes)	\$	5.000	\$ 40.000
Recubrimiento con oro para MEB	\$	4.000	\$ 64.000
Uso del MEB	\$	65.188	\$ 1.043.008
Uso de software	\$	62.500	\$ 1.000.000
<b>Subtotal</b>	<b>\$</b>	<b>74.188</b>	<b>\$ 1.147.008</b>

<b>TOTALES</b>			
Experimentación animal	\$	4.960.000	
Insumos quirúrgicos	\$	1.280.000	
Histología e inmunohistoquímica	\$	3.555.580	
<b>Total</b>	<b>\$</b>	<b>9.795.580</b>	

## Bibliografía

1. DANE, *Defunciones por grupo de edad y sexo, según departamentos de ocurrencia y grupos de causas de defunción*, Tabla 11, 2009.
2. Who, World Health Organization, *WHO: Ten leading causes of deaths in high-income and low-income and middle-income countries*. 2008.
3. Moll FL, Powell JT, Fraederich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. *Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011; Vol (41):51-58..
4. Baas AF, Kranendonk SE. *Abdominal Aortic Aneurism*. *Clinical Cardiogenetics*. 2011; Cap 27.
5. Goeau-Brissonniere O, Javerliat I, Coggia M. *Advances in Vascular Grafts for Thoraco-Abdominal Aortic Open Surgery*. *Thoraco-Abdominal Aorta: Surgical and Anesthetic Management*. 2011; (54).
6. Piterina AV, Cloonan AJ, Meaney CL, Davis LM, Callanan A, Walsh M T, Mcgloughlin TM. *ECM-based materials in cardiovascular applications: inherent healing potential and augmentation of native regenerative processes*, *Int J Mol Sci*. 2009; (10): 4375–4417.
7. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. 2008. New York: McGraw Hill.
8. Bittl J. *Catheter Interventions for Hemodialysis Fistulas and Grafts*. *J Am Coll Cardiol Interv*. 2010; (3)1–11.
9. Chalem F. et al. *tratado de medicina interna, 4ª ed.* 2005; editorial médica celsus. (1):1159.
10. Ethier J, Bragg-Gresham JL, Piera L, et al. *aspirin prescription and outcomes in hemodialysis patients: the dialysis outcomes and practice patterns study (dopps)*. *am j kidney dis*. 2007; 50(4):602-11.
11. Berardinelli L, *grafts and graft materials as vascular substitutes for haemodialysis access construction*. *eur j vasc endovasc surg*. 2006; (32): 203–211.
12. Scott E, Glickman M, *conduits for hemodialysis access*. *semin vasc surg*, 2007; (20): 158-163.

13. Jiménez-Almonacid P, Del Río P, Lasala M, et al. *primer acceso vascular no autólogo para hemodiálisis*. Nefrología.2004; (24):559-563.
14. Stehman-Breen K, Sherrard D, Gillen D, Caps M, *determinants of type and timing of initial permanent hemodialysis vascular access*. kidney international. 2000; (57):639–645.
15. Roy-Chaudhery P, Kelly B, Melhem M, et al. *vascular access in hemodialysis: issues, management, and emerging concepts*. cardiol clin. 2005; (23):249–273.
16. Naito Y, Shinoka T, Duncan, D, Hibino N, Solomon D, Cleary M, Rathore A, Fein C, Church S, Breuer C. *vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts*. adv drug deliver rev.2011; (63): 312 – 323.
17. Mcallister et al. *hemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft*. Lancet. 2009; (373)1440–1446.
18. Kaushal S, Amiel G E, Guleserian K J, Shapira O M, Perry T, Sutherland F W, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischo J, Mayer JE. *functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo*. nat med.2001; (7): 1035–1040.
19. Soletti L, Hong Y, Guan J, Stankus J, El-Kurdi M S, Wagner W R, Vorp D A. *a bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts*. acta biomater 2010; (6):110 – 122.
20. Ratcliffe A, *tissue engineering of vascular grafts*. matrix boil. 2000; (19):353–357.
21. Sandusky GE, Lantz GC, Badylak SF. *healing comparison of small intestine submucosa and eptfe grafts in the canine carotid artery*. j surg res. 1995; (58):415–420.
22. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. *extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function*. acta biomater. 2009; (5):1 – 13.
23. Kim BS, Park I K, Hoshiba T, Tiang HL, Choi YJ, Akaike T, Cho CS. *design of artificial extracellular matrices for tissue engineering*. prog polym sci. 2011; (36): 238– 268.
24. Badylak SF, Coffey AC, Geddes LE, Lantz GC. *tissue graft composition*. us patent. 1988; (4):178.
25. Lantz GC, Badylak SF, Hiles MC, Coffey AC, Geddes LE, Kokini K, Sandusky GE, Morff RJ. *small intestinal submucosa as a vascular graft: a review*. j invest surg.1993; (6):297–310.

26. Badylak SF, Gilbert T, Myers-Irvin J. *the extracellular matrix as a biologic scaffold for tissue engineering*. in tissue engineering. 2008: 121-128.
27. Badylak SF. *xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. transpl immunol. 2004; (12):367 – 377.
28. Lantz GC, Badylak SF, Coey AC, Geddes IE, Blevins WE. *small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog*. j invest surg. 1990; (3):217–227.
29. Sandusky GE, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz G. *histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs*. am j pathol.1992; (140): 317–324.
30. Huynh T, Abraham G, Murray J, Brockbank K, Hagen PO, Sullivan S. *remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel*. nat biotechnol. 1999; (17):1083–1086.
31. Kohler TR, Kirkman TR, Kraiss IW, Zierler BK, Clowes AW. *increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts*. circ res.1991; (69):1557–1565.
32. Holzapfel GA, Thomas C, Ogden RW. *a new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models*. printed in *cardiovascular soft tissue mechanics*. 2004.
33. Zulliger MA, Fridez P, Hayashi K, Stergiopoulos N. *a strain energy function for arteries accounting for wall composition and structure*. journal of biomechanics. 2004;(37), 989-1000.
34. Gundiah N, Ratcliffe MB, Pruitt IA. *determination of strain energy function for arterial elastin: experiments using histology and mechanical tests*. journal of biomechanics. 2007; (40):586-594.
35. Rezakhaniha R, Stergiopoulos N. *a structural model of the venous wall considering elastin anisotropy*. journal of biomechanical engineering.2014;(37).
36. Lanir Y. *a structural theory for the homogenous biaxial stress-strain relationships in flat collagenous tissues*. j. biomechanics. 1979; (12):423-436.
37. Fung YCh. *biomechanics: mechanical properties of living tissues*. second edition, springer-verlag, 1993.
38. Sacks MS. *biaxial mechanical evaluation of planar biological materials*. journal of elasticity. 2000; (61):199-246.

39. Choi HS, Vito RP. *two dimensional stress strain relationship for canine pericardium*. journal of biomedical engineering. 1990;(112):153-159.
40. Aristizábal HA. *caracterización mecánica de injertos de submucosa intestinal porcina (sis) en aplicaciones vasculares*, proyecto de grado (pregrado), universidad de los andes. Bogotá. 2009.
41. Beltrán R. *estudio de la remodelación de la pared arterial usando soportes de sis*, proyecto de grado, universidad de los andes, bogotá 2007.
42. Navarro J. *caracterización mecánica de injertos de submucosa intestinal y arterias, por medio de ensayos de tensión biaxiales y uniaxiales*. proyecto intermedio. universidad de los andes. Bogotá. 2009.
43. Sánchez, D. *análisis mecánico de injertos de colágeno en un modelo in vivo*, proyecto de grado, universidad de los andes. Bogotá. 2005.
44. Castañeda N. *cálculo de esfuerzos y deformaciones en la pared arterial*. proyecto de grado, universidad de los andes. Bogotá. 2009.
45. Navarro J. *caracterización mecánica de injertos de colágenos implantados en vena yugular, por medio de ensayos de tensión biaxial y de presión-volumen*. proyecto de grado. universidad de los andes. Bogotá. 2010.
46. Lally C, Reid A J, Prendergast PJ. *elastic behavior of porcine coronary artery tissue under uniaxial and equibiaxial tension*. annals of biomedical engineering. 2004; (32): 1355-1364.
47. Sacks MS. *a method for planar biaxial mechanical testing that includes in-plan shear*. journal of biomechanical engineering. 1999; (121): 551-555. Dee KC., *mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials. 2003; (24):3805-3813.
48. Vesely I. *the role of elastin in aortic valve mechanics*. journal of biomechanics. 1998; (31):115-123.
49. Dinnar U. *cardiovascular fluid dynamics*. crc press, united states, florida, 1981.
50. Brüel A, Oxlund H. *changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation endproducts of the rat aorta in relation to age*. Atherosclerosis. 1996;(127): 155-65.
51. Lee T C, Midura RJ, Hascall VC, Vesely I. *the effect of elastin damage on the mechanics of the aortic valve*. journal of biomechanics. 2001; (34):203-210.

52. Chesler NC, Thompson-Figueroa J, Millburne K. *measurements of mouse pulmonary artery biomechanics*. journal of biomechanical engineering. 2004; (126):309-314.
53. Meyerson SI , Moawad J, Loth F, Skelly Cl, Bassiouny HS, Mckinsey JF, Gewertz Bl, Schwartz IB. *effective hemodynamic diameter: an intrinsic property of vein grafts with predictive value for patency*. j vasc surg. 2000;(31): 910 – 917.
54. Wei HJ, Liang HC, Lee MH, Huang YC, Chang Y, Sung HW. *construction of varying porous structures in acellular bovine pericardia as a tissue-engineering extracellular matrix*. Biomaterials. 2005; (26):1905 – 1913.
55. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. *prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing*. Biomaterials.2007;(28):5009 – 5027.
56. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. academic press. 2004. elsevier academic press, second ed.
57. D'amore A, Stella JA, Wagner WR, Sacks MS. *characterization of the complete fiber network topology of planar fibrous tissues and scaffolds*. Biomaterials. 2010(31): 5345 – 5354.
58. Voronov R, Yangordon S, Sikavitsas VJ, Papavassiliou DV. *computational modeling of flow-induced shear stresses within 3d salt-leached porous scaffolds imaged via micro-ct*. journal of biomechanics; (43): 1279 – 1286.
59. Hibbeler, R. C., *structural analysis*. prentice hall. 2008.