



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Desarrollo de Conductos Bifásicos Laminares de
Colágeno Tipo I para Usar en Regeneración de Nervio
Periférico**

Diana Milena Millán Cortés

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Ciudad, Colombia

2022

**Desarrollo de Conductos Bifásicos Laminares de
Colágeno Tipo I para Usar en Regeneración de Nervio
Periférico**

**Development of Laminar Biphasic Conduits of Type I
Collagen for Use in Peripheral Nerve Regeneration**

Diana Milena Millán Cortés

Tesis de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Biotecnología

Directora:
Ph.D., Martha Raquel Fontanilla Duque

Línea de Investigación:
Biotecnología en salud

Grupo de Investigación:
Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Ciudad, Colombia
2022

A mis hijos Natalia y Jacobo, gracias por la oportunidad de ser madre y profesional, a mi amado esposo Ronald por ser mi compañero en este viaje, mi maestro, ejemplo, apoyo, guía y fortaleza.

Declaración de obra original

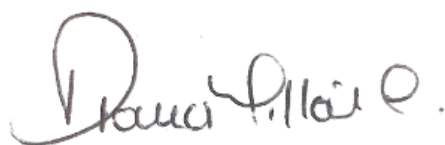
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



DIANA MILENA MILLÁN CORTÉS

Fecha 25/09/2021

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Martha Raquel Fontanilla Duque, mi directora de tesis, por su ejemplo, apoyo, confianza, enseñanzas y amistad. Al Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia, a Ronald Jiménez, Edward Suesca, Adriana Flórez, Ivan Poveda, Alejandra Torres, Ana Bermeo y Marta González por ser tan generosos con su conocimiento y trabajar como un equipo que busca siempre llegar a la meta juntos, a Socorro Prieto por su amistad, complicidad y todas las sonrisas.

Al Dr. Luis Eduardo Nieto Ramírez por su generosidad con el conocimiento y creer en lo que hacemos como grupo de investigación, al Dr. Luis Fernando Ospina y la veterinaria Eliana Ortiz por su apoyo incondicional en los experimentos animales. Al Dr. Manuel Alfonso Patarroyo, por ser ejemplo y dejar siempre las puertas abiertas de la FIDIC. Al personal de la Clínica Santa Barbara Complejo Quirúrgico por la consecución de las muestras de pacientes.

Al Dr. João F. Mano, Investigador Principal de CICECO – Instituto de Biomateriales de Aveiro y director del grupo de investigación COMPASS del Departamento de Química de la Universidad de Aveiro, Portugal, por su apoyo para adelantar parte de este trabajo.

Al Doctorado de Biotecnología, su equipo docente y administrativo

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin los aportes económicos del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias), el programa de becas de Estudiantes Sobresalientes de Posgrado de la Vicedecanatura Académica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y el apoyo de la Facultad de Medicina de la Universidad El Bosque.

Resumen

La carencia de nervios donantes ha conducido al desarrollo de conductos nerviosos para conectar los muñones nerviosos periféricos seccionados y ayudar a prevenir la formación de neuromas. A menudo, los diámetros estándar de estos dispositivos no se pueden adaptar en el momento de la cirugía al diámetro del nervio lesionado. En este trabajo, se desarrollaron soportes para formar conductos nerviosos rellenos con una matriz interna con canales unidireccionales cubiertos por una zona porosa multidireccional. Con tal fin, dos dispersiones de colágeno tipo I (5 mg/g y 8 mg/g) se congelaron secuencialmente utilizando diferentes métodos para obtener seis soportes laminares (NC, P1 a P5) formados por una zona con poros unidireccionales (U) adyacente a una zona de poros multidireccionales (M). Las propiedades fisicoquímicas y microestructurales de los soportes se determinaron y compararon, así como, su biodegradabilidad, el contenido de glutaraldehído residual y su citocompatibilidad. Adicionalmente, a los conductos obtenidos al enrollar los soportes desde la zona unidireccional a la multidireccional se les determinó el módulo de Young. Teniendo en cuenta los resultados de las evaluaciones mencionadas, se escogió el soporte P3 para determinar la proliferación y diferenciación de células mesenquimales de tejido adiposo humano (hASC). Las células sembradas en este soporte se adhirieron, alinearon en la misma dirección que las fibras unidireccionales del soporte, proliferaron y diferenciaron a células de Schwann. Los conductos P3 ajustables elaborados con el soporte P3 se implantaron en lesiones de nervio ciático de 10 mm en un modelo murino de lesión de nervio periférico. En estos ensayos se incluyeron lesiones injertadas con nervio ciático autólogo - considerado el tratamiento estándar - como control. Los resultados *in vivo* demostraron que el conducto P3 adaptado al diámetro de los muñones nerviosos sirve como guía del crecimiento axonal y promueve la regeneración nerviosa.

Palabras clave: Nervio periférico, conductos nerviosos, regeneración, axones.

Abstract

Shortness of donor nerves has led to the development of nerve conduits that connect sectioned peripheral nerve stumps and help to prevent the formation of neuromas. Often, the standard diameters of these devices cannot be adapted at the time of surgery to the diameter of the nerve injured. In this work, scaffolds were developed to form filled nerve conduits with an inner matrix with unidirectional channels covered by a multidirectional pore zone. Collagen type I dispersions (5 mg/g and 8 mg/g) were sequentially frozen using different methods to obtain six laminar scaffolds (P1 to P5) formed by a unidirectional (U) pore/channel zone adjacent to a multidirectional (M) pore zone. The physicochemical and microstructural properties of the scaffolds were determined and compared, as well as their biodegradability, residual glutaraldehyde and cytocompatibility. Also, the Young's modulus of the conduits made by rolling up the bizonal scaffolds from the unidirectional to the multidirectional zone was determined. Based on these comparisons, the proliferation and differentiation of hASC were assessed only in the P3 scaffolds. The cells adhered, aligned in the same direction as the unidirectional porous fibers, proliferated, and differentiated into Schwann-like cells. Adjustable conduits made with the P3 scaffold were implanted in rats 10 mm sciatic nerve lesions to compare their performance with that of autologous sciatic nerve grafted lesions. The *in vivo* results demonstrated that the tested conduit can be adapted to the diameter of the nerve stumps to guide their growth and promote their regeneration.

Keywords: Peripheral nerve, nerve conduits, regeneration, axons.

Contenido

1. Introducción	17
2. Marco conceptual	20
2.1. Fisiología del sistema nervioso.....	20
2.2. Neuronas, células gliales y formación de la mielina	22
2.3. Impulso nervioso.....	24
2.4. Anatomía del nervio periférico	26
2.5. Neurobiología de la regeneración de tejido nervioso periférico	27
2.6. Clasificación de las lesiones nerviosas	29
2.7. Tratamientos de la lesión neural periférica.....	31
2.7.1. Autoinjerto de nervio.....	33
2.7.2. Aloinjertos de nervio	34
2.8. Biomateriales e ingeniería de tejidos para la elaboración de conductos que guían la regeneración nerviosa (NGC).....	35
2.9. Colágeno tipo I y conductos nerviosos.....	37
2.10. Conductos nerviosos disponibles comercialmente	39
2.11. Diseño de un conducto nervioso ideal	45
3. Pregunta de investigación.....	48
4. Objetivo general	48
4.1. Objetivos específicos	48
5. Metodología	49
5.1. Métodos objetivo específico 1: <i>Elaborar conductos de colágeno tipo I con dos fases de diferente orientación de poro (unidireccional y multidireccional) y estructura tubular plegable.</i>	49
5.1.1. Extracción y purificación de colágeno I.....	49
5.1.2. Preparación de las dispersiones de colágeno tipo I entrecruzadas con glutaraldehído	49
5.1.3. Elaboración de los soportes laminares bifásicos	50
5.2. Métodos Objetivo Específico 2: <i>Determinar las propiedades físicoquímicas, microestructurales, mecánicas y biológicas de los conductos desarrollados.</i>	52
5.2.1. Caracterización microestructural.....	52

5.2.2.	Propiedades fisicoquímicas	55
5.2.3.	Propiedades mecánicas	60
5.2.4.	Propiedades biológicas	60
5.3.	Metodología objetivo 3: <i>Evaluar la biocompatibilidad de los conductos desarrollados como injerto de nervio periférico en un modelo murino de lesión crítica de nervio ciático.</i>	67
5.3.1.	Diseño experimental animal	67
5.3.2.	Evaluación de la función motora del tejido nervioso reparado	71
5.3.3.	Evaluación de los nervios regenerados.....	71
5.3.4.	Consideraciones éticas del manejo animal y residuos biológicos	73
5.3.5.	Análisis estadístico	74
6.	Resultados	75
6.1.	Resultados objetivo específico 1: <i>Elaborar conductos de colágeno tipo I con dos fases de diferente orientación de poro (unidireccional y multidireccional) y estructura tubular plegable.</i> 75	
6.1.1.	Apariencia macroscópica de los soportes	75
6.2.	Resultados objetivo específico 2: <i>Determinar las propiedades fisicoquímicas, microestructurales, mecánicas y biológicas de los conductos desarrollados.</i>	76
6.2.1.	Evaluación microestructural de los soportes elaborados	77
6.2.2.	Propiedades fisicoquímicas de los soportes desarrollados.....	80
6.2.2.1.	FTIR de los soportes desarrollados	80
6.2.3.	Propiedades mecánicas de los conductos desarrollados	85
6.2.4.	Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los soportes desarrollados	86
6.2.4.1.	Evaluación microscópica y caracterización de las células de Schwann aisladas de nervio ciático de ratones neonatos.....	86
6.2.4.2.	Aislamiento y diferenciación de células madre adiposas humanas (<i>hASC</i>)	87
6.2.4.3.	Evaluación de la citocompatibilidad: citotoxicidad, proliferación y diferenciación celular. 88	
6.2.4.4.	Inmunohistoquímica de los soportes cultivados con células de Schwann primarias y <i>hASC</i>	90
6.3.	Resultados objetivo 3: <i>Evaluar la biocompatibilidad de los conductos desarrollados como injerto de nervio periférico en un modelo murino de lesión crítica de nervio ciático.</i>	92
6.3.1.	Experimento animal.....	92
6.3.1.1.	Resultados postquirúrgicos	93

6.3.1.2.	Recuperación de la función motora (índice funcional ciático -SFI)	93
6.3.1.3.	Características clínicas de las lesiones nerviosas reparadas.....	94
6.3.1.4.	Análisis histomorfométrico de los nervios.....	96
6.3.1.5.	Análisis cualitativo del músculo gastrocnemio	100
7.	Discusión.....	102
8.	Conclusiones	109
9.	Recomendaciones	110
10.	Texto del artículo: “Adjustable conduits for guided peripheral nerve regeneration prepared from bi-zonal unidirectional and multidirectional laminar scaffold of type I collagen”	111
11.	Referencias.....	131

Índice de Figuras

Figura 1. Imagen transversal de la médula espinal y organización neuronal.....	21
Figura 2. Motoneurona con axón mielinizado	22
Figura 3. Organización estructural del nervio periférico.	27
Figura 4. Proceso de degeneración Waleriana.	29
Figura 5. Clasificación de las lesiones nerviosas por Seddon y reclasificación por Sunderland en grados de lesión 1-5.	31
Figura 6. Diseño propuesto para la elaboración de un conducto bifásico laminar de colágeno tipo I. 51	
Figura 7. Secciones que fueron tomadas de cada fase del conducto laminar para el análisis microestructural.....	53
Figura 8. Método de la burbuja captiva para determinar el ángulo de contacto.....	58
Figura 9. Nervio ciático empleado como fuente de células de Schwann.	62
Figura 10. Experimento animal.	70
Figura 11. Análisis histomorfológico.....	73
Figura 12. Evaluación macroscópica de un soporte laminar bifásico de colágeno tipo I y el conducto que resulta de su plegamiento.....	75
Figura 13. Soporte bifásico laminar de colágeno tipo I y formación de un conducto nervioso.	76
Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de los soportes laminares bifásicos.	78
Figura 15. Distribución del tamaño de poro.	79
Figura 16. Porosidad de los soportes bidimensionales de colágeno tipo I.....	80
Figura 17. Espectro FTIR de los soportes de colágeno elaborados.....	81
Figura 18. Porcentaje de entrecruzamiento, glutaraldehído residual y degradación de los soportes. 83	
Figura 19. Módulo elástico de los conductos desarrollados.....	85
Figura 20. Células de Schwann aisladas de nervio ciático de ratones neonatos.	86
Figura 21. Citometría de flujo de las células madre mesenquimales de tejido adiposo de tercer pasaje.	87
Figura 22. Ensayos de diferenciación de células madre mesenquimales humanas (<i>hASC</i>) en cultivo. 88	
Figura 23. Evaluación de la citocompatibilidad de los soportes.....	90

Figura 24. Microscopía de fluorescencia y evaluación inmunohistoquímica de los cultivos de células de Schwann en los soportes P1-P5.	91
Figura 25. Células hASC cultivadas en los soportes P3.	92
Figura 26. Huellas plantares.....	93
Figura 27. Índice funcional ciático.	94
Figura 28. Observación del nervio ciático intervenido y reparado.....	95
Figura 29. Evaluación histológica de secciones transversales de los nervios reparados teñidas con azul de toluidina.....	97
Figura 30. Imágenes de autofluorescencia representativas de los cortes longitudinales de los nervios tratados.	98
Figura 31. Análisis histomorfométrico.....	99
Figura 32. Evaluación histológica de cortes transversales del músculo gastrocnemio.	100
Figura 33. Evaluación de atrofia muscular de músculo gastrocnemio.	101

Índice de Tablas

Tabla 1. Productos de ingeniería de tejidos usados para regeneración de nervio periférico.	40
Tabla 2. Concentraciones de colágeno y glutaraldehído empleadas para elaborar los prototipos de los soportes	50
Tabla 3. Capacidad de sorción de líquido, hinchamiento, ángulo de contacto y potencial Zeta (ζ) de los soportes NC y P1-P5 (zonas M y U).	84

1. Introducción

Cada año, más de un millón de personas en todo el mundo se ven afectadas por lesiones de los nervios periféricos (1). Estas lesiones provocan limitaciones funcionales e impactos neuropáticos que alteran la calidad de vida de los pacientes y aumentan los costos en el sistema sanitario (2–4). Las lesiones que comprometen el tejido endoneural (neurotmesis) o sección completa de los axones (axonotmesis severa) requieren intervención quirúrgica (4).

Cuando el tamaño de la lesión lo permite, los procedimientos quirúrgicos reconstructivos comunes son las neurorrafias de extremo a extremo sin tensión (ETE) y de extremo a lado (ETS) (5,6). El procedimiento ETE sutura los muñones resultantes de un nervio seccionado y el procedimiento ETS coapta el muñón distal de un nervio lesionado a un nervio intacto adyacente (5,6). Cuando se alcanza una distancia crítica entre los muñones (>5mm), no se pueden lograr suturas sin tensión (7), por lo que es necesario el uso de autoinjertos de nervios sensoriales como método estándar para reconstruir los nervios seccionados motores. En los seres humanos, esta estrategia repara lesiones hasta de 5cm (5,8). Para este procedimiento, se emplean los nervios de la mano, el brazo o la pierna del paciente (e.g.: nervio cutáneo antebraquial, nervio sural, nervio cutáneo dorsal, nervio peroneo superficial y cutáneo posterior y lateral) (5). No obstante, algunas de las principales desventajas de los autoinjertos incluyen la morbilidad del sitio donante, la baja disponibilidad de nervio autólogo, la pérdida de sensibilidad y la incompatibilidad de diámetro entre los nervios donante y receptor (9). Además, el éxito del injerto puede estar limitado por el tamaño del defecto, la vascularización del nervio del donante y la arquitectura fascicular del injerto, entre otros (10).

Los aloinjertos se han propuesto como alternativa para superar la limitación de nervio autólogo donante. Estos deben ser procesados para garantizar la eliminación de antígenos que induzcan rechazo en el tejido receptor (11,12), lo cual aumenta el costo del producto. Hasta el momento, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos -FDA-

solo ha aprobado un producto basado en aloinjerto de nervio para la reconstrucción de nervio periférico (13).

Cuando no es posible hacer un autoinjerto o utilizar aloinjerto de nervio periférico, como injerto, se utilizan conductos elaborados con materiales naturales, sintéticos y compuestos por mezclas “compositos” diseñados para guiar el crecimiento de los axones seccionados (14). Los conductos son conocidos como conductos de guía nerviosa (NGC, por sus siglas en inglés), la mayoría de estos conductos son estructuras tubulares diseñadas para proteger y conectar los muñones de un nervio seccionado (14). El colágeno tipo I se encuentra entre los materiales naturales utilizados para fabricar conductos nerviosos artificiales (13,15–17). Esta proteína es el componente principal de la matriz extracelular del nervio periférico y fue el primer polímero natural utilizado para fabricar NGC para la regeneración de nervio periférico (18). La mayoría de los NGC elaborados con colágeno tipo I aprobados por la FDA son estructuras tubulares huecas, que se suturan a los muñones proximal y distal del nervio lesionado para conectarlo (8,19). Sin embargo, por carecer de microestructura interna que guíe el crecimiento axonal este puede limitarse y no ser suficiente para promover la reconexión axonal del muñón del nervio distal (20). En humanos, la evidencia indica que los NGC actuales funcionan bien cuando se injertan en lesiones menores a 3 cm, en brechas mayores las tasas de éxito disminuyen (14,19). No obstante, la regeneración inducida por los NGC sigue siendo significativamente menor que la observada con los autoinjertos (21). Por eso, sigue siendo una necesidad diseñar y evaluar nuevos dispositivos que promuevan la regeneración del nervio periférico.

La evidencia experimental indica que la presencia de una matriz interna con fibras orientadas unidireccionalmente en el lumen de los NGC impacta en los mecanismos de reparación de los nervios periféricos (22). Por ejemplo, los conductos de poli (acrilonitrilo-coacrilato) con fibras internas alineadas mejoraron la regeneración axonal en comparación con los fabricados con el mismo material, pero con fibras internas orientadas al azar (21). Conductos de poli(ϵ -caprolactona) alineados por electrohilado promovieron la maduración de las células de Schwann y el aumento en la expresión de glicoproteína asociada a mielina (MAG), genes de

proteína cero (P0) y proteína básica de mielina (MBP) (23). Además, se han elaborado láminas de ácido poliláctico (Microtube Array Sheet, MTAS) con topografía unidireccional que *in vitro* orientan la migración de las células de Schwann y la extensión de neuronas motoras de la raíz espinal y de los ganglios de la raíz dorsal (24). De igual manera, soportes cilíndricos de colágeno tipo I y elastina con poros unidireccionales obtenidos por congelamiento unidireccional y liofilización incubados con ganglios de la raíz dorsal de rata, promueven la migración alineada de axones y células de Schwann (25). La evaluación preclínica de los conductos antes mencionados sembrados previamente con células de Schwann en un modelo de defecto de nervio ciático en rata mostró animales recuperados sin signos de inflamación o formación de neuromas (26). A pesar de los datos preclínicos e *in vitro* que apoyan el uso de soportes con rellenos unidireccionales en la promoción del crecimiento guiado de axones y la reparación nerviosa (21), a la fecha, la FDA ha aprobado un solo conducto de colágeno tipo I y condroitin-6-sulfato elaborado con una matriz externa de colágeno tipo I y una matriz interna orientada unidireccionalmente (8,19).

Los NGC existentes se fabrican con diámetros fijos, por lo que la discordancia de los calibres entre el conducto y los muñones puede conducir al fracaso del injerto (9). Aunque en el mercado también existen soportes neuroprotectores usados para envolver el nervio lesionado que pueden ajustarse al diámetro del nervio (ej. NeuraWrapTM), no hay estudios que indiquen si es comparable con los conductos nerviosos tradicionales de diámetro fijo en términos de eficacia (19).

En trabajos anteriores hemos descrito la fabricación de soportes laminares alineados de colágeno tipo I (27). Para esto, dispersiones ácidas de esta proteína se congelan y liofilizan horizontalmente obteniéndose soportes laminares de 10 cm², con poros que forman canales con fibras unidireccionales en los que las células se adhieren y crecen alineadas. Esta tesis doctoral introdujo modificaciones a esta metodología, con el fin de desarrollar y evaluar preclínicamente un nuevo soporte laminar conformado por dos zonas continuas de poros orientados de manera diferente (unidireccional y multidireccional). Dado que las dos zonas son continuas, el cirujano puede enrollar el soporte de la zona unidireccional a la

multidireccional para formar un conducto ajustado al diámetro de los muñones del nervio periférico seccionado. Cuando se enrolla, la zona unidireccional del soporte constituye un relleno o matriz interior que se cubre con la zona multidireccional del soporte formando un conducto con canales internos orientados en una sola dirección. El soporte con arquitectura y configuración únicas representa una alternativa novedosa para producir una nueva generación de conductos que *in vivo* guíen la regeneración de nervio periférico, además, constituye el primer paso para elaborar sustitutos de nervio periférico a nivel nacional.

2. Marco conceptual

2.1. Fisiología del sistema nervioso

El sistema nervioso se divide anatómicamente en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC incluye el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico), y la médula espinal protegida por la columna vertebral. El SNP comprende 12 pares de nervios craneales provenientes de la base del encéfalo, 31 pares de nervios raquídeos provenientes de la médula espinal y ganglios asociados (e.g.: ganglios de la raíz dorsal, donde se acumulan los somas de los cuerpos neuronales) (28). Tiene un componente sensorial (aférente) que transmite los impulsos nerviosos al SNC, pasando por los ganglios sensitivos de la raíz dorsal para su procesamiento y respuesta. También, un componente motor (eferente) que se origina en el SNC y transmite impulsos a través de las neuronas de la raíz anterior a órganos efectores en la totalidad del cuerpo, es decir desde el SNC a la periferia. Las dos raíces compuestas de neuronas aferentes y eferentes se fusionan en un nervio mixto fuera de la médula espinal llamado nervio espinal que se extiende e inerva diferentes zonas del cuerpo (28) (**Figura 1**).

Funcionalmente, el sistema nervioso periférico se divide en sistema somático -relacionado con movimientos voluntarios- y sistema autónomo -relacionado con movimientos involuntarios- ambos con vías aferentes y eferentes (29). El sistema somático permite el movimiento voluntario a través de la vía aferente (sensorial y sensitiva que estimula la vista,

oído, olfato, gusto, tacto) y a través de la vía eferente (motora) para la contracción muscular generada por impulsos nerviosos mediados por el neurotransmisor acetil colina. El sistema nervioso autónomo, controla los movimientos involuntarios y se divide en simpático, relacionado con situaciones de alerta estimulado por la noradrenalina y parasimpático relacionado con la relajación, descanso y digestión (28).

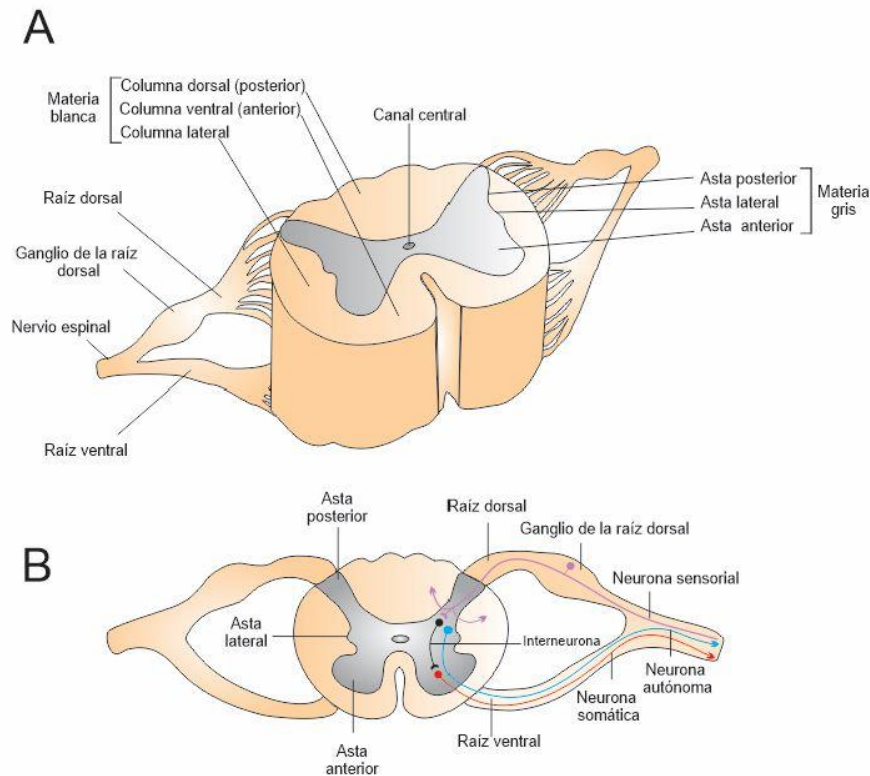


Figura 1. Imagen transversal de la médula espinal y organización neuronal. **A.** La imagen ilustra la sustancia blanca superficial formada por axones mielinizados y la sustancia gris profunda en forma de H conformada por somas neuronales que conducen los potenciales de acción hacia o desde el cerebro. La sustancia blanca y gris se dividen en tres zonas: dorsal (posterior), ventral (anterior) y lateral; en la sustancia gris esta división es llamada cuerno o asta dorsal (donde se ubican las neuronas receptoras sensitivas), cuerno ventral (donde se ubican las neuronas motoras) y la zona intermedia donde se ubican las interneuronas. El canal central es un espacio lleno de líquido cefalorraquídeo en el centro de la médula. **B.** En los ganglios de la raíz dorsal se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales pseudounipolares, los axones de estas neuronas que provienen de la periferia pasan hacia el cuerno posterior (dorsal) de la sustancia gris de la médula espinal, los axones hacen sinapsis con interneuronas o pasan a la sustancia blanca y ascienden (vía aferente) hacia el budo raquídeo en el encéfalo. La respuesta motora (eferente) es producida por una señal de las neuronas piramidales gigantes (señal corticoespinal) que viajan desde de corteza cerebral a la medula espinal. Los numerosos filamentos nerviosos dispuestos en los surcos ventrolateral y dorsolateral de la medula espinal se unen lateralmente formando las raíces ventral y dorsal de los nervios espinales, las dos

raíces, a su vez, se unen para formar los nervios espinales, en un punto situado distalmente al ganglio espinal que existe en la raíz dorsal.

2.2. Neuronas, células gliales y formación de la mielina

Las neuronas son células del SNC y SNP que varían en forma y tamaño de acuerdo con su localización. Se caracterizan por presentar un cuerpo celular o soma que contiene el núcleo y constituye el centro metabólico de la neurona, las dendritas que se extienden fuera del soma y el axón que se origina desde una parte gruesa del soma llamado como axónico (**Figura 2**). Según el número de proyecciones que surjan del cuerpo celular, las neuronas pueden clasificarse en unipolares, bipolares y multipolares. El axón presenta terminaciones presinápticas que contienen botones sinápticos con un contenido de gránulos o vesículas en los que se almacenan los neurotransmisores que son secretados para el estímulo nervioso (28).

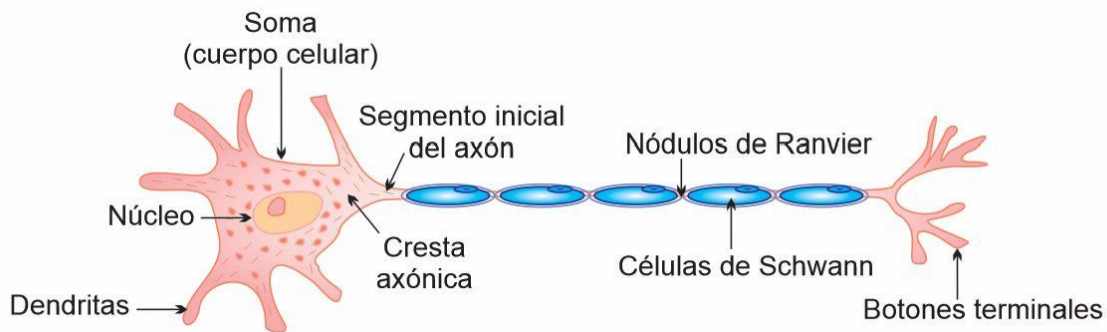


Figura 2. Motoneurona con axón mielinizado

Además de las neuronas, cuya función principal es transmitir el impulso nervioso, el sistema nervioso contiene células neurogliales para proteger y apoyar metabólicamente y mecánicamente a las neuronas (30). Estas células no generan impulsos nerviosos y aunque están presentes en el SNC y SNP, en cada uno de ellos su morfología, función y densidad poblacional son diferentes. Las células neurogliales del SNC incluyen los astrocitos que proporcionan soporte, eliminan iones y liberan neurotransmisores, los oligodendrocitos que actúan en el aislamiento eléctrico y producción de mielina, las células microgliales que hacen parte del

sistema fagocítico mononuclear y las células endoteliales que forman membranas limitantes y pueden intervenir en el transporte de líquido cefalorraquídeo (30). En el SNP existe menos diversidad celular, se encuentran las células satélite o de sostén que rodean los somas de las neuronas de los ganglios periféricos y las células de Schwann cuya función principal es formar recubrimientos mielinizados y no mielinizados en los axones del SNP (30).

La mielina que envuelve los axones es una membrana plasmática especializada que funciona como aislante efectivo en un flujo de corriente insignificante. En el SNC esta membrana es aportada por los oligodendrocitos; allí, un solo oligodendrocito puede mielinizar varios axones. En el SNP es la membrana de las células de Schwann la que envuelve un axón al plegarse hasta 100 veces sobre sí misma. Cada célula de Schwann forma una unidad de mielina que es separada por nódulos de Ranvier, aunque la ultraestructura es similar en SNC y SNP, se pueden apreciar algunas diferencias en los componentes lipídicos y proteicos de los dos sistemas (31).

La mielina en el SNC y SNP esta compuesta principalmente por lípidos (70-80%) como colesterol, fosfolípidos (plasmalógeno) y glicolípidos (galactosilceramida); el contenido de fosfatidilcolina y esfingomielina, es mayor en el SNP que en el SNC (32). El constituyente proteico de la mielina se encuentra en menor proporción (15-30%) con respecto a los lípidos y varía en composición y concentración de acuerdo con su localización. En el SNP, las proteínas implicadas en la formación y compactación de mielina son la proteína P0 como principal componente estructural de mielina (50%), seguido de la proteína básica de mielina (MBP), la proteína 2 de mielina periférica (P₂ o FABP8, de sus siglas Fatty Acid Binding Protein-8) y la proteína periférica de mielina de 22 kDa (PMP22) (32); Además de las proteínas compactantes, se encuentran las no compactantes implicadas en las interacciones axón-glía, entre ellas conexinas (Cxs), glicoproteína asociada a mielina (MAG, L-larga y S-corta), cadherina epitelial (EC) y periaxina (PRX, L-larga y S-corta). Algunas de las proteínas compactantes y no compactantes son comunes en el SNC y SNP y otras son reemplazadas en su función. Por ejemplo, en el SNC se encuentra el proteolípido proteico (PLP) que reemplaza la función de P0; también, se encuentran la proteína básica oligodendrocítica

asociada a mielina (MOBP), la proteína de oligodendrocitos (OSP) y proteínas no compactantes como juxtánodina (Jux), la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) y sirtuína 2 (S2) (31). La función de estas proteínas es compactar la mielina a través de sus interacciones en la porción extracelular de la membrana. En el caso de las células de Schwann las interacciones proteicas ocurren entre las proteínas presentes en la membrana celular y la membrana yuxtapuesta de la misma célula cuando esta se pliega. La compactación de la mielina es evidente en microscopía electrónica, donde las características repetitivas densas en electrones son denominadas líneas densas principales (MDL) y el compartimento intramielínico alterno se denomina línea intraperíodo (IPL). Adicionalmente, los lípidos que componen la mielina son claves en funciones importantes como sinaptogénesis, neuritogénesis y la rápida conducción saltatoria del impulso nervioso (31–33).

2.3. Impulso nervioso

La función principal de las neuronas es la transmisión del impulso nervioso. Estas células se caracterizan por la excitabilidad de su membrana después de recibir un estímulo eléctrico, químico o mecánico. En respuesta a estos estímulos la permeabilidad iónica de la membrana celular cambia, originándose impulsos eléctricos rápidos que se miden en milisegundos (ms), con potenciales que se miden en milivoltios (mV). Cuando la membrana está en reposo (sin estímulo), se encuentra polarizada con cargas positivas en la cara extracelular y negativas en la cara citoplasmática. En las neuronas, la concentración de K^+ en el interior es mayor que en el exterior de la célula, lo cual, permite su movilización hacia afuera de la célula. Por el contrario, la concentración de Na^+ es mayor en el exterior que en el interior y su movilización ocurre hacia adentro de la célula. El paso de los iones de un lado al otro de la membrana celular ocurre por difusión facilitada, a través de canales de fuga específicos para cada uno de estos iones. También, por medio de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa que funciona en contra del gradiente de concentración. El potencial de membrana en reposo en el extremo citoplasmático es -70mV (28).

Cuando la neurona recibe un estímulo su membrana se despolariza y ocurre la apertura de canales dependientes de voltaje específicos que permiten el ingreso de Na^+ al citoplasma y el cambio del potencial de membrana. Si se abren suficientes canales de Na^+ y se alcanza un umbral de intensidad de -55mV , se cumple la ley de todo o nada y la despolarización se propaga por toda la célula abriendo los canales de Na^+ restantes. Lo cual, cambia el potencial de acción de la cara citoplasmática de la membrana de negativo a positivo alcanzando $+40\text{mV}$. Cuando la célula alcanza este potencial se repolariza, cierra los canales de Na^+ y abre los canales dependientes de voltaje para el K^+ . La salida de este ion resulta en un periodo de hiperpolarización (-90mV), que se mantiene hasta que la bomba Na^+ y K^+ restablece la concentración de Na^+ y K^+ y la célula vuelve al estado de reposo de -70mV (28).

Como la mielina es un aislante efectivo del flujo de corriente, la despolarización en los axones mielinizados salta de un nódulo de Ranvier a otro (conducción saltatoria) para alcanzar una velocidad 50 veces mayor que la de los axones no mielinizados. El impulso de un axón presináptico induce secreción de neurotransmisores - conocido como sinápsis química - los neurotransmisores difunden a través de la hendidura sináptica induciendo cambios en la membrana de la célula postsináptica, excitándola o inhibiéndola (28). En la unión neuromuscular, el nervio motor termina sobre una fibra muscular estriada y la transmisión de impulsos del nervio motor al músculo es similar a la que ocurre en la sinapsis entre las neuronas. El impulso que llega a la terminación neuronal motora aumenta la permeabilidad de la membrana a los iones Ca^{+2} presentes en el ambiente extracelular, los que al entrar en las terminaciones de los axones activan la exocitosis de las vesículas que contienen el neurotransmisor acetilcolina. El neurotransmisor liberado, difunde a los receptores colinérgicos nicotínicos que activan la despolarización celular en la placa muscular por aumento en la conductancia de iones Na^+ y K^+ ; de esta manera, el potencial de acción muscular inicia la contracción muscular (28).

2.4. Anatomía del nervio periférico

Los tejidos nerviosos periféricos son estructuras anatómicas que pueden estar formados por una combinación de fibras nerviosas aferentes y eferentes. Los cuerpos celulares de las células que forman las fibras nerviosas en los nervios periféricos se encuentran en el sistema nervioso central o en los ganglios periféricos. Cada nervio periférico está formado por uno o más haces de fibras nerviosas denominados fascículos. Cada fibra nerviosa individual está constituida por axones revestidos por células de Schwann que a su vez son recubiertos por una lámina basal. Los axones son rodeados por un delicado tejido de sostén laxo y vascular denominado **endoneuro** que constituye la capa interna de revestimiento. El endoneuro está compuesto por fibras de colágeno tipo I/III y se ubica entre la lámina basal que reviste las células de Schwann que rodean cada axón y el **perineuro**. Las fibras de colágeno que componen el endoneuro, especialmente en la parte más externa, se encuentran dispuestas en canales orientados de manera unidireccional que proporcionan un entorno protector a los axones. En lesiones nerviosas leves (e.g.: compresiones nerviosas) ayudan a mantener los extremos de los axones dañados alineados facilitando su reparación. Además, la unión del endoneuro con las células de Schwann previene la interferencia en la conducción de los impulsos nerviosos de los axones vecinos (34).

El perineuro es la capa intermedia de revestimiento que rodea los fascículos y está compuesto por una capa de células epiteliales planas, con forma poligonal denominadas células perineurales. El diámetro de los fascículos es definido por las placas formadas por las células perineurales que se unen entre sí a través de uniones estrechas y desmosomas, para actuar como una barrera de protección y de difusión selectiva para los axones (34). En el perineuro el colágeno tipo I es ausente, pero se encuentran pequeñas cantidades de colágeno tipo IV en la lámina basal.

En los nervios periféricos formados por más de un fascículo, existe otra capa de tejido conectivo laxo localizado en la parte externa del fascículo denominada **epineuro**. Esta capa externa de revestimiento está constituida por colágeno tipo I y III, grasa y vasos (arteriales,

venosos y linfáticos) que proceden de tejidos adyacentes y de las arterias que acompañan a los nervios (29), proporciona soporte a los fascículos y los mantiene unidos para formar una fuerte vaina cilíndrica denominada tronco nervioso (**Figura 3**) (34). Análisis inmunohistoquímicos y de microscopía de luz polarizada con marcadores de colágeno específicos, indican que el colágeno tipo I se encuentra en mayor proporción en el epineuro que en el endoneuro y que el colágeno tipo III es más abundante en el endoneuro que en el epineuro; esta relación de colágeno I/III es similar en mamíferos humanos, cerdos y ratas (35). Dentro del endoneuro los fibroblastos son escasos, por eso, se supone que la mayor parte del colágeno del endoneuro es producido por las células de Schwann (34,36).

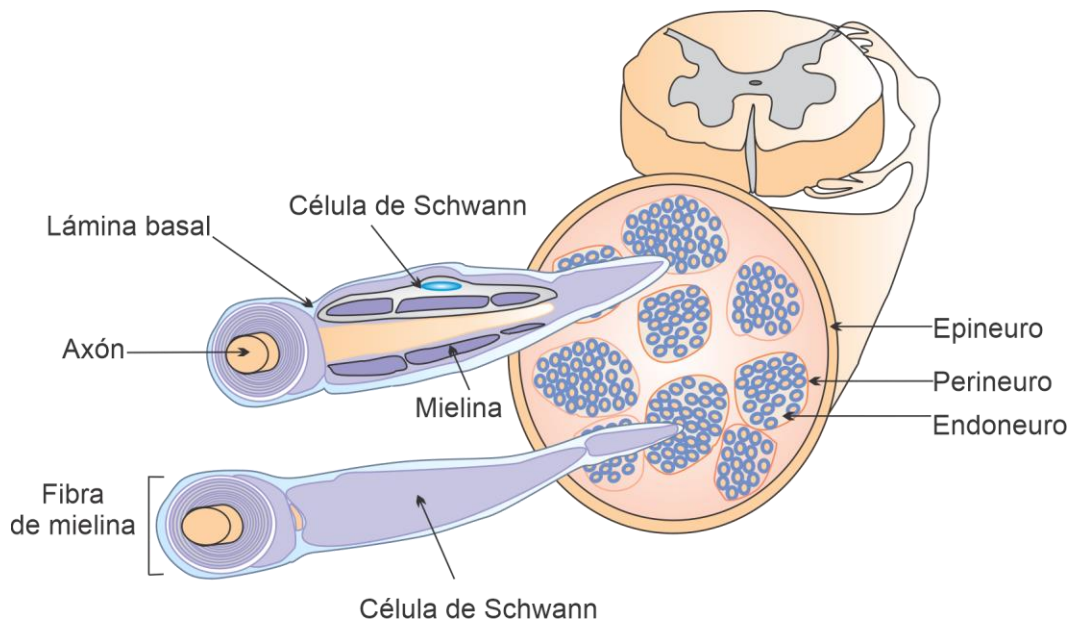


Figura 3. Organización estructural del nervio periférico. Se aprecia el axón de una fibra mielinizada, rodeado por las células de Schwann que sintetizan una delgada lámina basal. La fibra mielinizada se encuentra rodeada de tejido endoneural, varias fibras nerviosas son agrupadas por la capa perineural formando los fascículos, que a su vez son rodeados por tejido epineural, formando el tronco nervioso que proviene de la médula espinal.

2.5. Neurobiología de la regeneración de tejido nervioso periférico

El sistema nervioso periférico, a diferencia del sistema nervioso central, tiene la habilidad intrínseca para repararse y regenerarse. Esta capacidad depende de la edad del paciente, la causa y el tipo de lesión. Es un proceso complejo que involucra una serie de eventos celulares

y moleculares en el soma de los axones, en los extremos o muñones proximal o distal del nervio y en el órgano blanco que inerva (37). En las lesiones de nervios periféricos que conducen a rotura axonal o transección nerviosa, se inician cambios degenerativos como la degradación del axón y la mielina en el extremo proximal y distal del sitio de la lesión. Cuando el extremo distal del axón se desconecta del soma neural, sufre degeneración Walleriana o degeneración anterógrada donde los componentes de la membrana y el citoesqueleto del axón son desensamblados, el axón es fragmentado y la mielina es degradada. Los macrófagos infiltrados en el sitio de la injuria y las células de Schwann se encargan de remover los restos de la degradación de la lesión. En el cuerpo neural se observa actividad eléctrica antidrómica, con potenciales de acción de alta frecuencia que ocasionan la apertura de canales de calcio y el inicio de cascadas de señalización, mediadas por la Junquinasa, que regulan la transcripción de genes que codifican para factores neurotróficos (38). El balance de la transcripción, traducción y secreción de estos factores neurotróficos determina la suerte - sobrevivencia o muerte por apoptosis - de la neurona. Las neuronas sensoriales primarias son significativamente más vulnerables a la apoptosis que las motoneuronas ya que cerca del 40% de las neuronas sensoriales mueren después de una lesión nerviosa (38).

Para promover la regeneración neuronal y lograr la reconstrucción estructural y funcional de los axones, es crítico limitar la etapa de degeneración Walleriana. En las primeras 24 horas, las células de Schwann proliferan y se desdiferencian cambiando su fenotipo de células productoras de mielina a células con capacidad regenerativa. Las células de Schwann denervadas disminuyen la expresión de proteínas estructurales como la proteína cero (P0), proteína básica de mielina (PBM), glicoproteínas asociadas a mielina y aumentan la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM), L1, neural CAM (NCAM), proteína ácida fibrilar de la glía y de factores de crecimiento como factor de crecimiento de nervio (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y neurotrofina 3 (NT-3). Una vez el detritus celular es removido por los macrófagos y las células de Schwann, estas se alinean y forman columnas denominadas bandas de Bünger, que permiten la formación de

un ambiente rico en factores neurotróficos y proporcionan una guía axonal para la regeneración del axón hasta el sitio blanco de inervación; el axón regenerado nuevamente es mielinizado y ocurre una recuperación funcional del tejido muscular denervado (**Figura 4**) (37).

El progreso ideal de recrecimiento axonal es de 1mm/día, sin embargo, si los brotes axonales fallan en cruzar el sitio de la lesión o pierden su dirección, las células de Schwann regulan negativamente la expresión de factores neurotróficos agotando los factores tróficos presentes en el sitio de la lesión, lo cual, conduce a la formación de un neuroma. Cuando esto ocurre, el órgano que estaba inervado pierde la continuidad nerviosa, se produce una denervación crónica, atrofia de la fibra muscular y las células satélite musculares sufren apoptosis (11,37).

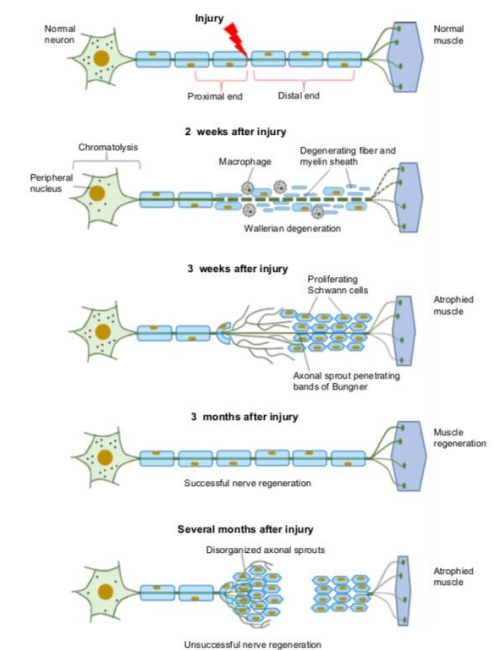


Figura 4. Proceso de degeneración Waleriana. Se observan células de Schwann formando canales denominados Bandas de Bünger y regeneración completa del axón después de 3 meses de ocurrida la lesión, también se observa gráficamente brotes axonales no regenerados y atrofia muscular (11).

2.6. Clasificación de las lesiones nerviosas

La primera clasificación de las lesiones de los nervios fue propuesta por Seddon en 1943 (39), en ella, las lesiones nerviosas son clasificadas de acuerdo con su desenlace en lesiones

temporales (neurapraxia, axonotmesis) y permanentes (neurotmesis). En la neurapraxia hay una pérdida temporal de las funciones sensoriales y motoras generada por la disrupción parcial de la conducción en el sitio de la lesión (e.g.: las neuropatías por compresión como el síndrome de túnel carpiano), en este caso la estructura básica del axón es preservada y no ocurre la degeneración Walleriana. En la axonotmesis se presenta la rotura del axón y de la vaina de mielina que lo envuelve, pero hay preservación de las envolturas del nervio (endoneuro, perineuro, epineuro), ocurre degeneración Walleriana del axón distal y regeneración espontánea propiciada por la preservación de los tubos endoneurales. En la neurotmesis hay una interrupción completa de las tres capas que forman el nervio, hay degeneración Walleriana, la lesión es más grave y la regeneración depende de la distancia entre la zona distal y proximal del nervio (40,41).

La clasificación de Seddon fue modificada por Sunderland en 1951(42), para categorizar las lesiones nerviosas en grados 1 hasta 5 dependiendo de su severidad. La lesión de **primer grado** corresponde a la neurapraxia definida por Seddon. En la lesión de **segundo grado**, el endoneuro y las células de Schwann permanecen intactos y aunque la recuperación es lenta, el endoneuro permite la regeneración de manera direccionada en la zona distal al sitio de la lesión. En la lesión de **tercer grado**, el endoneuro es irrumpido, aunque el perineuro permanece intacto; en este caso, la fibrosis ocurre intrafascicularmente, la función motora y sensorial decrecen y la recuperación es muy lenta. En las lesiones de **cuarto grado**, el endoneuro y el perineuro son seccionados y el epineuro es la única porción del nervio que permanece intacta, hay un proceso de degeneración y cicatrización especialmente en la zona proximal. En este nivel se requiere la escisión de la cicatriz y la reparación del nervio quirúrgicamente. La lesión de **quinto grado** corresponde a la neurotmesis; en este caso, se genera una interrupción completa del nervio que involucra el endoneuro, perineuro y epineuro. Ocurre la formación de un neuroma en el extremo proximal del nervio y degeneración Walleriana en el extremo distal. Las lesiones de quinto grado requieren reparación quirúrgica (**Figura 5**) (40,41).

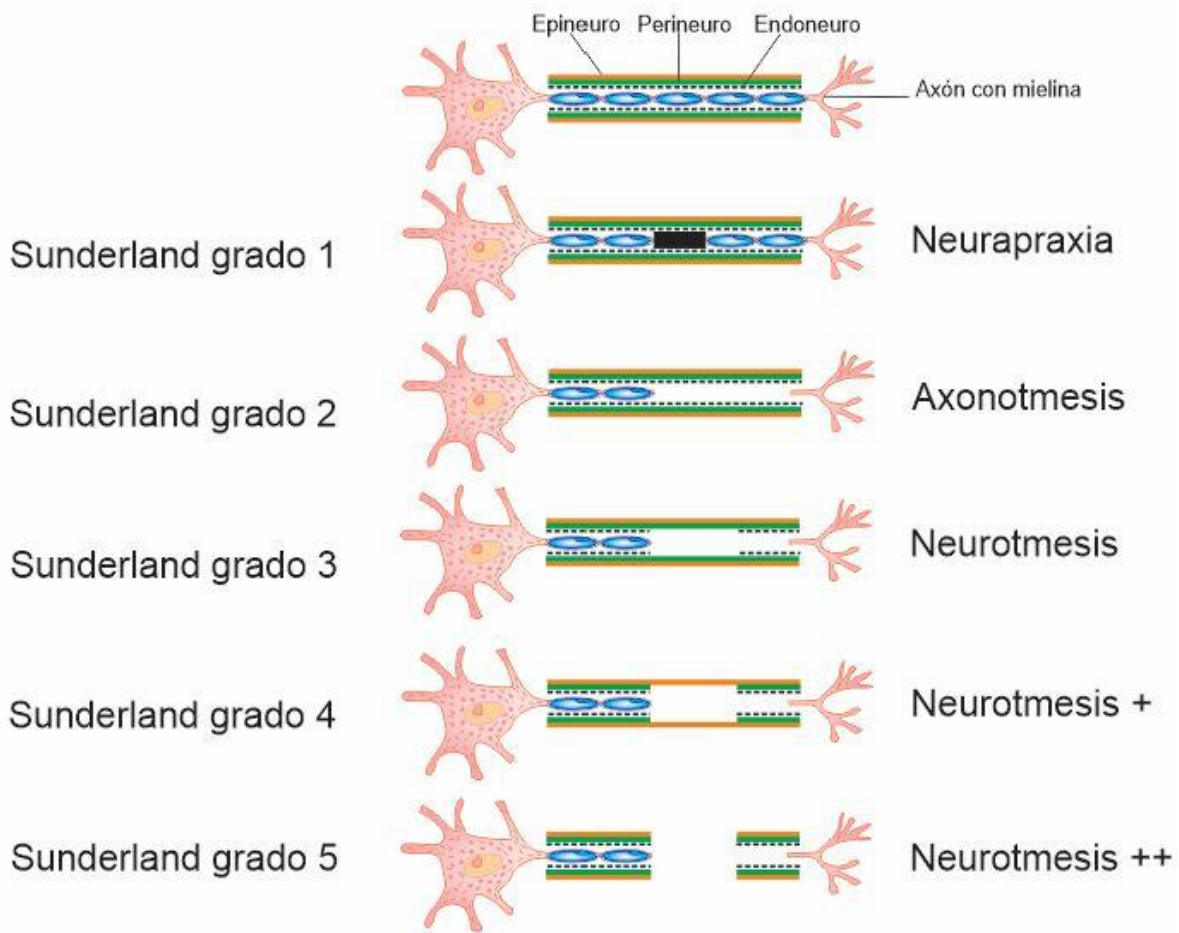


Figura 5. Clasificación de las lesiones nerviosas por Seddon y reclasificación por Sunderland en grados de lesión 1-5.

2.7. Tratamientos de la lesión neural periférica.

El tratamiento de elección cuando se diagnostica una lesión neural periférica completa es la neurorrafia, una técnica microquirúrgica que consiste en la aproximación sin ejercer tensión, de los extremos del nervio que se fijan con suturas epineurales. El procedimiento debe realizarse en las primeras 24 horas de ocurrida la lesión, siempre que la distancia entre los muñones nerviosos sea menor a 5mm (7). Las neurorrafias emplean diferentes técnicas para la coaptación de los nervios, entre las que se encuentran:

- i) Técnica de reparación epineural: es el método tradicional que utiliza suturas de sujeción lateral y puntos de referencia vasculares para mantener la alineación topográfica. Las suturas se colocan pasando la aguja por el epineuro interno y externo de ambos muñones para aproximar los extremos nerviosos hasta lograr la reparación final. Una desventaja de la reparación epineural es la incapacidad de emparejar con precisión los fascículos proximal y distal del nervio seccionado
- ii) Técnica de reparación fascicular agrupada: potencialmente esta técnica es más precisa que la reparación epineural. Está indicada en situaciones en las que una parte identificable de la sección transversal del nervio suministra la función sensorial mientras que otra parte del nervio suministra la función motora. En la reparación fascicular agrupada, las microsuturas se colocan a través del tejido epineural interfascicular evitando el perineuro y permitiendo la coaptación de grupos fasciculares desde el muñón proximal al distal. Luego, se anudan con una tensión leve a moderada evitando que los fascículos sobresalgan
- iii) Reparación fascicular individual: se aplica cuando los fascículos lesionados individuales proximal y distal puede unirse específicamente entre sí (43).

Además de las neurorrafias descritas, conocidas como neurorrafias de extremo a extremo (ETE, del inglés End to End) o termino terminal, se pueden realizar neurorrafias de extremo a lado (ETS, del inglés End to Side) o termino lateral, en las que se coapta el muñón distal de un nervio lesionado a un nervio donante sano adyacente. En caso de que la anastomosis nerviosa - conexión quirúrgica entre dos estructuras tubulares - no pueda realizarse con sutura debido a la distancia entre los muñones distal y proximal, lo indicado es usar otras técnicas como el injerto (5,6).

2.7.1. Autoinjerto de nervio

El autoinjerto de nervio es el tratamiento recomendado cuando el tamaño de la lesión no permite la aproximación sin tensión de los extremos de los muñones nerviosos; se considera el “gold standard” de los tratamientos y se ha utilizado desde 1879. Es la alternativa terapéutica que ofrece mejores resultados clínicos, porque logra regeneración nerviosa en defectos con longitud superior a los 5 cm (5). En las últimas décadas, las técnicas empleadas para hacer autoinjertos han logrado grandes avances como el injerto de nervio interfascicular para la unión de nervios distantes (44). Los tejidos nerviosos donantes incluyen nervios funcionalmente menos significativos como el nervio sural, los nervios cutáneos superficiales y el nervio cutáneo medial del antebrazo. Las limitaciones asociadas con este procedimiento incluyen:

- i) Morbilidad y pérdida de la función en el sitio donante debido a que la longitud de nervio donante que se colecta debe ser 10% mayor que la brecha de la lesión en donde se va a implantar (43).
- ii) Cirugía adicional con el objetivo de extraer el autoinjerto nervioso
- iii) Falta de correspondencia anatómica precisa con respecto al grupo fascicular donde va a ser injertado. Se ha visto que diferencias en el diámetro y longitud de nervio donado con respecto al nervio receptor conducen a la falla de los injertos.
- iv) Formación de neuromas dolorosos
- v) Aumento de costos relacionados con el cuidado del paciente (45).

A pesar del sustancial aumento de la comprensión de los procesos neuropatofisiológicos ocurrido en los últimos 30 años, todavía es necesario desarrollar nuevas estrategias o alternativas para no sacrificar tejido nervioso del donante (45,46).

2.7.2. Aloinjertos de nervio

Una alternativa a los autoinjertos es el uso de tejido nervioso proveniente de donantes vivos o cadavéricos (aloinjertos). Cuando la reconstrucción requiere injertos de tamaños mayores a la cantidad disponible de autoinjerto, el uso de tejido nervioso de cadáveres se convierte en la mejor opción. Los aloinjertos frescos contienen antígenos asociados con las células y sus productos (aloantígenos), que conducen al rechazo inmunológico y obligan a la inmunosupresión sistémica mientras los axones y células de Schwann del paciente regeneran a través del aloinjerto (47). Para evitar este inconveniente, se acude a remover los aloantígenos descelularizando los aloinjertos con métodos físicos, químicos y enzimáticos. Los métodos físicos más comunes son la liofilización, irradiación gamma, congelamiento y descongelamiento, sonicación y agitación. Los métodos químicos emplean soluciones ácidas o alcalinas, iónicas o no iónicas, soluciones hipertónicas o hipotónicas y detergentes (SDS, Triton X-100, Sulfobetaína-10, Sulfobetaína-16)(47,48). Los métodos enzimáticos incluyen el uso de condroitinasa, tripsina, endonucleasas y exonucleasas (47). En el proceso de descelularización se debe realizar la remoción total de cualquier agente químico y proteico que pueda causar daño o rechazo inmunológico en el tejido receptor. Además, se debe garantizar la eliminación de proteoglicanos que contengan condroitin sulfato u otros glicosaminoglicanos que inhiben el crecimiento axonal. El empleo de detergentes y enzimas, como la condroitinasa ABC (ChABC), para eliminar compuestos celulares y componentes de matriz extracelular, además del proceso de esterilización, aumentan el costo del producto y limitan el acceso de la mayoría de la población a los mismos (11,12).

Hasta el momento, el único aloinjerto descelularizado que ha sido aprobado por la FDA y aplicado en clínica es Axogen Avance® Nerve Graft, (AxoGen® Inc., Alachua, FL)(14,47). La investigación actual sugiere que los aloinjertos nerviosos procesados como Axogen Avance®, tienen limitaciones. Datos clínicos muestran que en defectos con tamaños entre 5 y 50 mm, el 87% de 132 lesiones nerviosas tratadas con Axogen Avance® recuperaron funciones sensoriales y/o motoras, sin embargo, en lesiones superiores a este tamaño su eficacia fue inferior a la de los autoinjertos (49). Debe mencionarse que en ensayos clínicos

que compararon la eficacia de Axogen Avance® con conductos que guían la regeneración nerviosa (NGC) disponibles en el mercado, se encontró que los resultados sensoriales son significativamente mejores con el aloinjerto (50).

2.8. Biomateriales e ingeniería de tejidos para la elaboración de conductos que guían la regeneración nerviosa (NGC).

Un amplio rango de biomateriales de origen natural o sintético, biodegradables y no biodegradables, se han empleado para la elaboración de conductos que sirvan como guía o puente neuroprotector que promueva el crecimiento de los axones en el sitio de la lesión. Los primeros conductos que guían la regeneración nerviosa NGC del inglés *Nerve Guidance Conduit*, se elaboraron con materiales no biodegradables (metacrilato, poliestireno, politetrafluoroetileno y silicona) y se ensayaron en lesiones nerviosas de roedores y humanos. Por no ser biodegradables presentaron inconvenientes como encapsulación fibrótica del implante, pérdida tardía de la recuperación funcional causada por la compresión de los axones dentro del conducto no degradable, y respuesta inflamatoria crónica (51,52).

Con los avances de la medicina regenerativa, surgió una rama de la ingeniería de tejidos denominada ingeniería de tejido neural con el propósito de elaborar conductos biocompatibles que sustituyan los injertos autólogos (*Engineered Nerve Grafts*, TENGs de sus siglas en inglés). Los NGC producidos por la ingeniería de tejido neural están diseñados para conectar los extremos de los nervios lesionados, guiar el crecimiento axonal, facilitar la difusión de oxígeno y nutrientes, garantizar la disponibilidad de factores neurotróficos y prevenir la formación de tejido fibrótico. Para su elaboración se usan materiales biodegradables naturales como proteínas, dentro de las que se encuentran el colágeno, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina y fibroína de seda (53,54); También, polisacáridos como la quitina, ácido hialurónico y alginato y algunos poliésteres de origen natural como el poli (3 hidroxibutirato) o P3HB y el poli (3 ácido hidroxibutirico-co-3 ácido hidroxivalerico) (55). De igual forma, se han empleado materiales de origen sintético biodegradables, solos o combinados, como policaprolactona (PCL), poliuretanos (PUs), ácido poliláctico (PLA),

ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico- poliglicólico (PLGA) (11,14,56,57). La mayoría de los NGC propuestos por la ingeniería de tejido neural se han evaluado en modelos murinos y caninos de escisiones de nervio ciático de diferentes longitudes (5mm, 10mm, 30 mm y 1,5 cm y 8 cm, respectivamente) (56). Cada NGC evaluado se diferencia en el tiempo de reparación y el grado de recuperación sensorial o motora (11). Estas diferencias dependen de las características microestructurales, fisicoquímicas y mecánicas de los conductos elaborados. Hasta el momento los NGC solo han demostrado regeneración nerviosa en distancias pequeñas que no superan los 30 mm (58). De ahí, que la elaboración y evaluación de conductos nerviosos continua siendo un reto para la ingeniería de tejidos.

Para aumentar la eficiencia en la regeneración nerviosa se usa la estrategia de cargar los NGC con células de Schwann o células madre de fuentes diferentes (59). Las células de Schwann son la primera elección porque secretan factores neurotróficos, como el factor de crecimiento de nervio (NGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). A pesar de los beneficios que trae usar estas células, su utilización es limitada debido a que se deben emplear células de Schwann autólogas. Como su tasa de proliferación es baja, el cultivo *in vitro* de células de Schwann primarias puede resultar dispendioso y demanda que los medios se suplementen con factores de crecimiento y/o mitógenos (Forskolina, heregulina, FGF2 y extracto de pituitaria, etc). Además, es común que los fibroblastos que crecen más rápido que las células de Schwann contaminen el cultivo dificultando el aislamiento. Para contrarrestar el crecimiento excesivo de los fibroblastos se adiciona citosina arabinosido, se promueve la lisis mediada por complemento y la sustitución de aminoácidos esenciales como la L-valina por D-valina (60). Una dificultad adicional importante es que para obtener las células de Schwann autólogas se debe sacrificar un nervio donante sano. Muchas veces, con el fin de aumentar la cantidad de células de Schwann se hace una primera cirugía en la que se induce la pre-degeneración del nervio con el fin de estimular la proliferación celular, lo cual, conlleva la realización de una segunda intervención quirúrgica para recolectar las células que proliferaron (61).

Para reemplazar a las células de Schwann se ha acudido al uso de células madre de diferente fuente porque tienen la capacidad de diferenciarse a células similares a células de Schwann (Schwann like-cells) (62). Se han evaluado células madre embrionarias, células madre neurales, células madre mesenquimales de médula ósea, células madre de tejido adiposo, células madre precursoras derivadas de la piel y células madre pluripotentes inducidas que secretan proteínas o factores neurotróficos y componentes de la matriz extracelular, que proporcionan un microambiente favorable para promover la formación de mielina y la regeneración nerviosa acelerando el crecimiento de los axones (62). Sin embargo, las revisiones sistemáticas sobre el empleo de células madre de diferente fuente para la regeneración de lesiones de nervio periférico muestran que los resultados del tratamiento que se evidencian evaluando la función motora/sensorial, electrofisiología, índice funcional ciático, masa muscular, y evaluación histológica varían de acuerdo al protocolo experimental empleado (59). El uso de células madre en este campo, aún se encuentra en la etapa preclínica y no se han logrado avances significativos en la práctica clínica (63), la aplicación de células madre dentro de los conductos nerviosos mejora el crecimiento y guía de los axones en comparación con el conducto nervioso sin células madre, no obstante, sigue siendo inferior a la reparación de nervios con técnicas convencionales como el autoinjerto (64).

2.9. Colágeno tipo I y conductos nerviosos.

El colágeno es una proteína estructural de la matriz extracelular (MEC) presente en la mayoría de los tejidos conectivos de los vertebrados. Comprende una familia de por lo menos 28 miembros que se caracterizan por poseer un dominio triple-helicoidal en su estructura. Se numeran con números romanos del I al XXVIII. Aunque se reportó un colágeno epidérmico como el miembro 29 de la familia, el gen que lo codifica (COL29A1) resultó ser idéntico a uno de los genes del colágeno VI (COL6A5) (65).

Los colágenos fibrilares, tiene una estructura jerárquica compleja que se sustenta en la triple hélice formada por tres cadenas peptídicas α , numeradas con números arábigos. La estructura

primaria de cada cadena α está conformada por una secuencia de tripletes repetidos de aminoácidos Gly-X-Y, donde X y Y son prolina y 4-hidroxiprolina, respectivamente. Al ser sintetizadas, las cadenas α se entrelazan en una triple hélice estabilizada por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Cuando las cadenas son iguales forman homodímeros, cuando son diferentes heterodímeros. La estructura terciaria del colágeno tipo I corresponde a una triple hélice heterodimérica constituida por las cadenas $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(II)$, y $\alpha 2(I)$, cada una de aproximadamente 1000 aminoácidos. Una vez las moléculas helicoidales son secretadas se autoensamblan y las fibrillas de colágeno se entrecruzan por enlaces covalentes formados enzimáticamente por la enzima lisil oxidasa (LOX). En este proceso ocurre la desaminación oxidativa de residuos específicos de lisina e hidroxilisina que forman alisinas en los dominios de los telopéptidos de la molécula de colágeno, dando lugar a una forma supramolecular constituida por fibrillas y fibras de colágeno (65–67).

El colágeno tipo I, es el colágeno más abundante de la MEC de los tejidos conectivos no cartilaginosos como piel, hueso, tendón, dentina, ligamentos, cornea, y nervio entre otros. Proporciona resistencia a la deformación plástica y la rotura. Junto con la elastina soporta esfuerzos mecánicos repetitivos y con los proteoglicanos y glicosaminoglicanos amortigua cargas compresivas ya que secuestran agua en la MEC (66). Al ser componente básico de la matriz, el colágeno se caracteriza por su biocompatibilidad y capacidad de unión a receptores celulares como integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 10\beta 1$), discoidinas (DDR) y los dominios RGD de unión a integrinas expuestos cuando el colágeno es remodelado o degradado a gelatina (66). Los soportes o membranas elaborados con colágeno tipo I son esponjas porosas que contiene una arquitectura 3D. Pueden ser diseñados, dependiendo de la técnica, para que su microestructura coincida con la de los tejidos del lugar de implantación previsto. Por lo tanto, los soportes de colágeno se utilizan ampliamente para promover la regeneración del tejido conectivo, incluyendo el nervioso periférico (66).



Los soportes de colágeno tipo I diseñados para regeneración nerviosa son biocompatibles, flexibles, suaves y fáciles de manipular quirúrgicamente. Tienen la ventaja de que en la medida en que se degradan ocurre la regeneración nerviosa, previniendo así la compresión

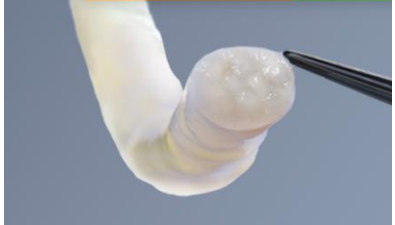
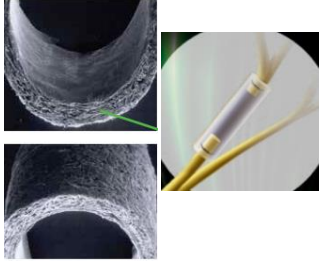

nerviosa que se puede presentar con los conductos elaborados con otros biomateriales de degradación lenta. Por eso, la mayoría de conductos aprobados por la FDA para uso clínico son elaborados con colágeno tipo I de diferente fuente (bovina, porcina) o conductos provenientes de nervios descelularizados (cadavéricos) o de matriz extracelular de tejidos ricos en colágeno tipo I (Submucosa intestinal porcina) (14).


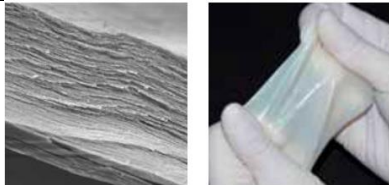
2.10. Conductos nerviosos disponibles comercialmente


Desde mediados de 1980 en el mercado se encuentra una variedad de conductos nerviosos artificiales conocidos como *Nerve Guidance Conduit* (NGC). Estos conductos se consideran dispositivos médicos indicados para el tratamiento de lesiones de nervios periféricos y cuentan con aprobación de agencias regulatorias como la FDA (US Food and Drug Administration) o la CE de la Comunidad Europea (14,68). Los conductos aprobados son elaborados a partir de biomateriales naturales o sintéticos, biodegradables o no biodegradables y algunos son elaborados a partir de tejidos descelularizados. La **Tabla 1** muestra algunos de estos productos:

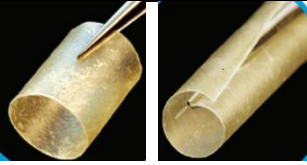
Tabla 1. Productos de ingeniería de tejidos usados para regeneración de nervio periférico. Elaborado con información de (11, 14, 19).

Producto	Biomaterial	Diámetro (D) Longitud (L)	Tiempo de Degradación	Compañía Productora	URL/Imagen del Producto
Neurotube® (K983007, 1999)	Ácido poliglicólico (PGA)	D: 2.3-8mm L: 2-4 cm	Degradación: 6-12 meses	Neuroregen LLC	 <p>URL: http://www.synovismicro.com/pdfs/NeuroTube_sellsheet_40014B_09-10.pdf</p>
Salubridge™ (K002098, 2000) SaluTunnel™ (K100382, 2010)	Alcohol polivinilico (PVA)	D: 2-10mm L: 6.35 cm	No degradable	Salumedica, LLC Atlanta, GA	<p>Imagen no disponible</p> <p>URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K100382.pdf</p>
Neurolac® (K050573, 2005; K112267, 2011)	Ácido poly(DL-lactide-ε-caprolactone), (PCL)	D: 1.5-10mm L: 3 cm	Degradación: 24 meses	Polyganics, The Netherlands	 <p>URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/K050573.pdf</p>

AxoGen Avance®	ECM de nervio de donante cadavérico	D: 1-5mm L: 1.5-7 cm	No reportado	AxoGen Inc. Alachua, FL	 <p>URL: http://content.stockpr.com/axogeninc/files/docs/LB-312+R00+Avance+Process+Matters.pdf</p>
NeuraGen® (K011168, 2001)	Colágeno tipo I	D: 1.5-7mm L: 2-3 cm	Degradación: 36-48 meses	Integra Life Sciences Corp. Plainsboro, NJ	 <p>URL: http://www.integralife.com/products%2Fpdfs%2Fnerve%20repair%20solutions%20brochure.pdf</p>
NeuraMatrix™ (K012814, 2001)	Colágeno tipo I	D: 2-6mm L: 2.5 cm	Degradación: 3-6 meses	Collagen Matrix Inc. Oakland, NJ	 <p>URL: http://az621074.vo.msecnd.net</p>

					t/syk-mobile-content-cdn/global-content-system/SYKGCSDOC-2-38822/1YaU8Cn9AtIMJkdy49Kth_K1qNUSIA/LNM_OT.pdf
NeuraWrap™ (K041620, 2004)	Colágeno tipo I diseñado para generar diámetros ajustables (No está claro si NeuraWrap™ es comparable con los conductos nerviosos tradicionales de tamaño fijo en términos de eficacia).	D: 3-10 mm L: 2-4 cm	Degradación: 36-48 meses	Integra Life Sciences Corp. Plainsboro, NJ	 <p>URL: http://www.integralife.eu/products/recon/tissue-technologies/neurawrap-nerve-protector/</p>
NeuroLac™ (K050573, 2005)	Copolimero ácido láctico y caprolactona	D: 4-10mm L: 3 cm	Degradación: pierde sus propiedades mecánicas a las 10 semanas después de la implantación	POLYGANICS	URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/K050573.pdf
Cova™ ORTHO-NERVE (K103081, 2012)	Colágeno porcino (membrana de colágeno)	Láminas rectangulares que se pueden enrollar. Tamaños: 15 x 25 mm, 20 x 30 mm, 30 x 40 mm	Degradable enzimáticamente <i>in vitro</i> (no reporta tiempo)	Biom'Up S.A.	 <p>URL:</p>

		y 40 x 60 mm			https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K103081.pdf
-NeuroMend™ (K060952, 2006) -Neuroflex™ (K131541, 2014)	Colágeno tipo I	NeuroMend™ M: D: 4-12mm L: 2.5-5 cm Neuroflex™: D: 2-6mm L: 2.5 cm	Degradación: 4-8 meses	Collagen Matrix Inc. Oakland, NJ	 <p>URL: http://www.collagenmatrix.com/peripheral-nerve-repair/</p>
NeuraGen® 3D Nerve Guide (K130557, 2014)	Conducto de colágeno bovino tipo I y una matriz interna compuesta de colágeno y glucosaminoglicano (condroitina-6-sulfato).	D: 1.5-7mm L: 6.35 cm	Degradación: Reabsorbible (no reporta tiempo)	Integra LifeSciences	URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/K130557.pdf
Surgisis® Nerve Cuff K031069, 2014	Submucosa intestinal porcina (SIS)	D: 2-7mm L: 5cm	Degradación: Reabsorbible (no reporta tiempo)	Cook Biotech Incorporated	URL: https://www.accessdata.fda.gov/CDRH510K/K132660.pdf
Reaxon™ Plus (K143711, 2015)	Quitosano (Indicado para la reparación de las discontinuidades de	D: 2.1-6mm L: 3 cm	Degradación: 17 meses	Medovent GmbH	URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/K143711.pdf

	los nervios periféricos hasta 10 mm)				
AxoGuard [®] Nerve protector AxoGuard [®] Nerve connector (K162741, 2016)	Submucosa intestinal porcina (SIS)	D: 1.5-7mm L: 4cm	Degradación: 3 meses	Cook Biotech Products West Lafayette, IN	 <p>URL: http://www.axogeninc.com/products/4144/axoguard-nerve-protector</p>
Neurobridge [™] (K152967, 2016)	Ácido poliglicólico (PGA)	D: 0.5-4mm L: 3-5 cm	Degradación: Se degrada <i>in vitro</i> (no reporta tiempo)	Toyobo Co., Ltd	URL https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf15/K152967.pdf
Reinforced Flexible Collagen Nerve Cuff (K170656, 2017)	Colágeno tipo I de tendón bovino	D: 2-6mm L: 2.5 cm	Degradación: Se degrada <i>in vitro</i> (no reporta tiempo)	Collagen Matrix, Inc	URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/K170656.pdf

Comparar el desempeño de los productos reportados en la **Tabla 1** es difícil debido a la falta de estandarización de modelos preclínicos, métodos de evaluación y estudios clínicos que comparen su seguridad y eficacia. Cada dispositivo ha demostrado una eficacia variable en estudios preclínicos y clínicos en diferentes tipos de nervios lesionados, tamaños de lesión, métodos de evaluación sensorial y motora y distintas poblaciones de pacientes. Por eso, las ventajas y desventajas de cada conducto deben ser determinadas cuidadosamente. Todas las revisiones concuerdan en que los conductos diseñados con biomateriales solo se pueden emplear en lesiones menores a 3 cm, ya que cuando el tamaño de la lesión es superior no se obtiene una regeneración óptima. De ahí, que para obtener productos que puedan ser trasladados a la clínica, se deba seguir trabajando en el desarrollo y caracterización de conductos biomiméticos seguros y eficaces (19).

2.11. Diseño de un conducto nervioso ideal

Diferentes revisiones han recopilado información sobre las características microestructurales, fisicoquímicas y biológicas de un conducto de nervio ideal (20,69). En general, se acepta que los conductos para promover la regeneración de nervio periférico tengan las siguientes características:

- i) **Biocompatibilidad:** una vez injertados en el nervio lesionado deben promover una apropiada respuesta celular y molecular.
- ii) **Biodegradabilidad:** su degradación y reabsorción deben estar en equilibrio con la regeneración axonal para evitar la compresión del nervio en crecimiento.
- iii) **Propiedades mecánicas:** deben ser similares a las de los nervios receptores en que van a ser implantados.
- iv) **Capacidad de soportar cargas fisiológicas:** deben tener flexibilidad y rigidez moderadas para resistir a las tensiones de compresión mecánica de los tejidos circundantes.

- v) Permeabilidad: deben permitir el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos y al mismo tiempo evitar la infiltración de fibroblastos de los tejidos circundantes (20,69).

La permeabilidad esta relacionada con el tamaño de poro y la porosidad del conducto. Se ha reportado que el tamaño de poro debe ser $\sim 10 - 40 \mu\text{m}$ y la porosidad del 80% (19,20). En cuanto a la estructura, los conductos con relleno en el interior promueven mejor crecimiento de los axones y proliferación de células de Schwann que los conductos huecos. De igual manera, en los conductos rellenos diseñados con orientación de fibras alineadas el crecimiento de los axones es más rápido que en los conductos con orientación de fibras aleatorias (70). Aunque se elaboran conductos con microestructura en el interior con diferentes biomateriales y mediante diferentes métodos de fabricación (e.g.: evaporación de solventes y lixiviación de partículas porógenas, espumado con gas, separación de fase, electro-hilado, extrusión, fabricación aditiva o impresión 3D y sus variables, entre otros) (71), muchos aún se encuentran en ensayos preclínicos y son pocos los que cuentan con autorización de las agencias regulatorias para aplicación clínica. De los productos aprobados por la FDA que se encuentran en el mercado, Neuragen 3D® incorpora un relleno con fibras alineadas longitudinalmente de colágeno tipo I y condroitin-6-sulfato. El conducto está recomendado para reparar defectos con longitud $< 30 \text{ mm}$ y no supera el tamaño reparado por aloinjertos como AxoGen Avance® (50 mm) o autoinjertos de nervio que funcionan en defectos $> 50 \text{ mm}$ (58).

Una falencia que tiene el diseño de los conductos para nervio periférico es que tienen un diámetro definido, lo cual, limita su capacidad de adaptarse al diámetro de los muñones seccionados. Cuando los conductos no se pueden ajustar a los extremos de los nervios seccionados el conducto colapsa y como consecuencia la regeneración del nervio es deficiente y la reinervación muscular disminuye (9). Productos constituidos por una lamina o soporte poroso, como Neurawrap™, que se colocan envolviendo al nervio seccionado para ajustar el dispositivo al diámetro del nervio buscan superar este inconveniente. Sin embargo,

no tienen microestructura interna y funcionan como conductos neuroprotectores que generan una interface entre el nervio y el tejido circundante (72).

Hasta donde se sabe, la literatura científica especializada no ha descrito soportes de colágeno tipo I para regeneración nerviosa que cumplan con todas las características de un conducto de nervio ideal. En nuestro país, los conductos nerviosos comerciales son poco empleados debido a su limitado éxito en regeneración y a su elevado costo, lo que obliga a seguir empleando el autoinjerto; además, la investigación en regeneración nerviosa es incipiente y debe expandirse para ofrecer alternativas terapéuticas que puedan ser trasladadas del laboratorio a la clínica.

2.12. Antecedentes del Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos (GTIT) de la Universidad Nacional de Colombia

En su interés por utilizar proteínas de la familia del colágeno para elaborar productos de ingeniería de tejidos que sirvan como injerto y promuevan la regeneración tisular, el GTIT desarrolló y caracterizó un soporte laminar de colágeno tipo I con canales orientados unidireccionalmente (27). En estos soportes se sembraron fibroblastos primarios aislados de mucosa oral, los cuales se adhirieron a las fibras de colágeno y crecieron unidireccionalmente expresando factores de crecimiento diferentes a los expresados cuando fueron sembrados en soportes con fibras de colágeno orientadas multidireccionalmente o al azar (73). Teniendo en cuenta estos resultados, en esta tesis doctoral se modificó el procedimiento de manufactura de los soportes unidireccionales elaborados por el grupo, para crear un soporte laminar de colágeno tipo I con dos zonas continuas, cada una con diferente orientación de poro (unidireccional, vs, multidireccional). Cuando el soporte bifásico obtenido se enrolla de la zona unidireccional a la multidireccional, se forma un conducto que en su interior contiene un relleno fibroso con canales paralelos orientados en una misma dirección, el cual, está cubierto por la zona multidireccional del soporte. Este diseño novedoso del soporte permite que el diámetro del conducto formado se pueda ajustar al diámetro de los muñones de los nervios seccionados, controlando el número de plegamientos que se hacen del soporte.

3. Pregunta de investigación

¿Un soporte de colágeno tipo I con dos zonas continuas con diferente orientación de poro (unidireccional, multidireccional) al plegarse de la fase unidireccional a la multidireccional forma un conducto que promueve la regeneración del nervio ciático en lesiones de tamaño crítico en un modelo murino?

4. Objetivo general

Desarrollar y evaluar la biocompatibilidad de conductos bifásicos laminares de colágeno tipo I para usar en regeneración de nervio periférico.

4.1. Objetivos específicos

- Elaborar conductos de colágeno tipo I con dos fases de diferente orientación de poro (unidireccional y multidireccional) y estructura tubular plegable.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas, microestructurales, mecánicas y biológicas de los conductos desarrollados.
- Evaluar la biocompatibilidad de los conductos desarrollados como injerto de nervio periférico en un modelo murino de lesión crítica de nervio ciático.

5. Metodología

5.1. Métodos objetivo específico 1: *Elaborar conductos de colágeno tipo I con dos fases de diferente orientación de poro (unidireccional y multidireccional) y estructura tubular plegable.*

Las variables que se tuvieron en cuenta en el diseño y elaboración de los soportes bifásicos laminares de colágeno tipo I fueron: concentración de colágeno tipo I, concentración de agente entrecruzante y método de congelamiento. A continuación, se describe la metodología realizada:

5.1.1. Extracción y purificación de colágeno I.

El protocolo empleado para la extracción y purificación de colágeno tipo I fue el establecido por el grupo de trabajo en ingeniería de tejidos de la Universidad Nacional de Colombia (74). El colágeno tipo I fue purificado a partir de fascia bovina proveniente de la planta de producción San Martín, Bogotá. Antes de su procesamiento la fascia bovina se limpió, se desinfectó con hipoclorito de sodio 2% y se conservó en etanol 70%. El tejido se fraccionó en piezas pequeñas que fueron colocadas en ácido acético 0.5 M por 24 h para obtener una dispersión que fue centrifugada (3000 g x 45 min) con el propósito de aislar el sobrenadante. Sobre el sobrenadante se adicionó NaOH 1M, se centrifugó y se tomó el precipitado de colágeno I resultante. Después de cuantificarlo gravimétricamente, se prepararon dos dispersiones de colágeno en ácido acético 0.05 N con las que se elaboraron los soportes bifásicos. La dispersión menos concentrada (5 mg/g) se utilizó para elaborar las zonas unidireccionales y la más concentrada (8 mg/g) para preparar las zonas multidireccionales de los soportes de colágeno I que se fabricaron.

5.1.2. Preparación de las dispersiones de colágeno tipo I entrecruzadas con glutaraldehído

Se prepararon seis dispersiones de cada una de las dos concentraciones evaluadas (5 mg/g y 8 mg/g). Cada una de estas dispersiones fue entrecruzada con concentraciones ascendentes

(0%, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% y 0.1% v/v) de glutaraldehído (GTA), homogenizada con un Ultra-turrax (Heidfold) a 10.000 rpm por 3 min, e incubada por 24 h a 37 °C en un agitador orbital (Thermo Fisher, USA) a 120 rpm. Con las dispersiones entrecruzadas se elaboraron seis prototipos de soportes bifásicos que se denominaron de acuerdo con la concentración de entrecruzante empleada, como: NC (0%), P1 (0.02%), P2 (0.04%), P3 (0.06%), P4 (0.08%) y P5 (0.1%), (NC, P1-P5). La **Tabla 2** muestra los prototipos de los soportes, así como, las concentraciones de las dispersiones de colágeno y de GTA utilizadas.

Tabla 2. Concentraciones de colágeno y glutaraldehído empleadas para elaborar los prototipos de los soportes

Prototipos	Dispersión de colágeno para la zona unidireccional	Dispersión de colágeno para la zona unidireccional	Concentración de GTA
NC	5 mg/g	8 mg/g	0% v/v
P1	5 mg/g	8 mg/g	0.02% v/v
P2	5 mg/g	8 mg/g	0.04% v/v
P3	5 mg/g	8 mg/g	0.06% v/v
P4	5 mg/g	8 mg/g	0.08% v/v
P5	5 mg/g	8 mg/g	0.1% v/v

5.1.3. Elaboración de los soportes laminares bifásicos

Para la obtención de los soportes laminares bifásicos, las dispersiones de colágeno de 5 mg/g y 8 mg/g se congelaron diferencialmente y se liofilizaron. Seis moldes de teflón se adaptaron para contener dos pozos separados y continuos por molde. La superficie de uno de los pozos se cubrió con una lamina de un material conductor a la que se le dejó un extremo que salía del molde. En estos pozos se sirvieron las dispersiones de colágeno tipo I de 5 mg/g y el extremo libre de cada lámina conductora se sumergió en nitrógeno líquido (-196 °C). El sistema se mantuvo adiabático, con el fin de promover la formación unidireccional de

cristales de hielo del lado cercano al nitrógeno al lado contrario (74). Después de que cada dispersión de 5 mg/g se congeló con el gradiente de concentración generado a partir del nitrógeno, la separación empleada para formar los dos pozos dentro del molde se retiró y en el pozo vacío se sirvió la dispersión de 8 mg/g de colágeno I. El molde con las dos dispersiones (la congelada con el gradiente de temperatura generada por el nitrógeno y la recién servida) se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche; luego, se liofilizó durante 48 h para obtener un soporte de 10 cm^2 con una zona con poros unidireccionales seguida por una zona con poros multidireccionales, los soportes obtenidos fueron esterilizados con oxido de etileno. La **Figura 6** presenta un diagrama de los soportes bifásicos en los que se identifican las zonas con poros multidireccionales y unidireccionales. El diagrama también muestra el plegamiento de la zona unidireccional a la multidireccional que permitió obtener seis conductos con una matriz interna con canales unidireccionados y una envoltura externa con poros orientados multidireccionalmente.

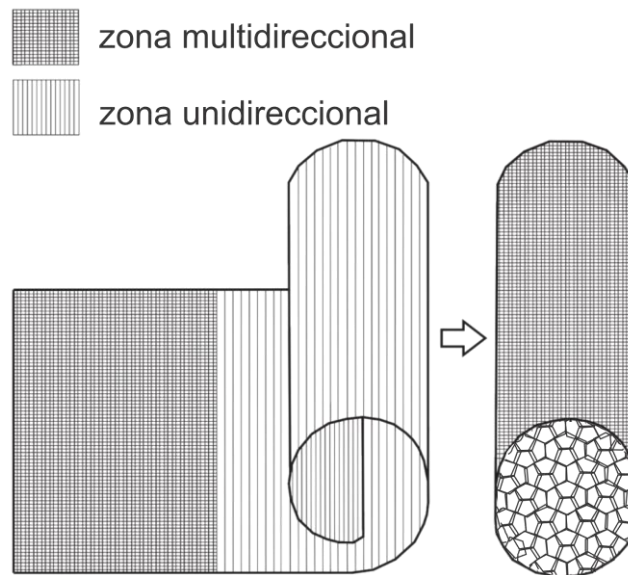


Figura 6. Diseño propuesto para la elaboración de un conducto bifásico laminar de colágeno tipo I. Esquema de la orientación de poro unidireccional, multidireccional y plegamiento del conducto desde la zona unidireccional hacia la zona multidireccional.

5.2. Métodos Objetivo Específico 2: *Determinar las propiedades físicoquímicas, microestructurales, mecánicas y biológicas de los conductos desarrollados.*

Con el propósito de establecer el efecto de las variables de diseño (concentración de colágeno, direccionalidad de poro y concentración de agente entrecruzante) sobre las propiedades de los conductos, se realizó la caracterización de los soportes bifásicos (NC, P1-P5) como se enuncia a continuación:

-Caracterización microestructural: se evaluó la apariencia microestructural de los soportes, el tamaño de poro y la porosidad.

-Caracterización físicoquímica: se usó análisis FTIR para verificar el estado nativo del colágeno. Además, se estableció el porcentaje de entrecruzamiento, la concentración de GTA remanente, el porcentaje de degradación enzimática, el ángulo de contacto (humectabilidad), la capacidad de sorción de agua, el hinchamiento y el potencial Z.

-Caracterización mecánica: se determinó el módulo elástico a través de ensayos mecánicos.

-Evaluación biológica *in vitro*: se estudió la citotoxicidad, proliferación y diferenciación celular.

5.2.1. Caracterización microestructural

Esta caracterización se hizo porque el direccionamiento de las fibras de colágeno, el tamaño de poro y la porosidad influyen en el crecimiento, migración y alineación celular en los soportes, así como, en la difusión de moléculas a través del soporte (69).

5.2.1.1. *Microscopía de barrido ambiental (ESEM)*

Siguiendo metodología descrita (27), cualitativamente se evaluó el direccionamiento de las fibras y la interconectividad de los soportes laminares usando ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopes) (Tescan Vega 3 SB, Czech Republic) en muestras sin

recubrimiento metálico, usando secciones transversales y longitudinales (8 mm [Ø], 2 mm [H]) de los soportes en la zona unidireccional (U), multidireccional (M) y la interfase (I), lugar donde se encuentran las zonas U y M. Para este análisis, se tomaron fotografías a una magnificación de 45 X y 150 X en tres sitios al azar en cada zona (**Figura 7**).

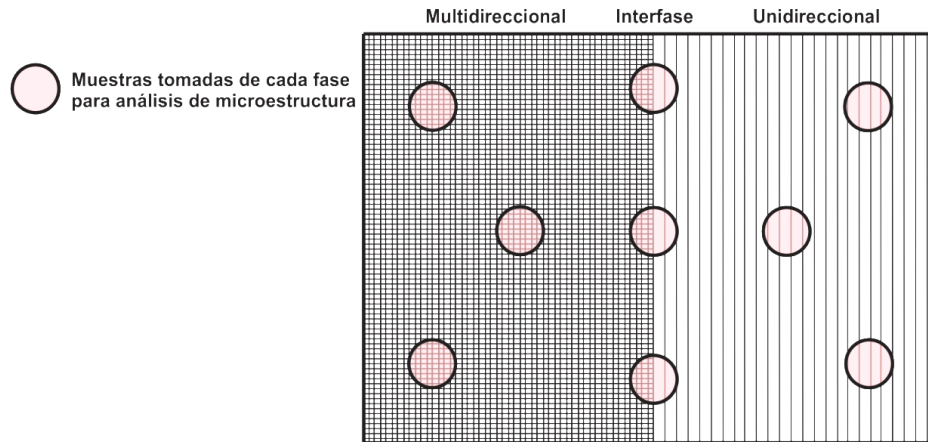


Figura 7. Secciones que fueron tomadas de cada fase del conducto laminar para el análisis microestructural.

5.2.1.2. *Tamaño de poro*

La determinación del tamaño de poro de cada una de las zonas de los soportes se hizo siguiendo metodología establecida (75). Se realizaron cortes transversales de aproximadamente 100 μm de grosor de muestras hidratadas con PBS (pH 7.4, 24 h) y desgasificadas de los soportes NC, P1-P5 en las zonas U (3 zonas evaluadas) y M (3 zonas evaluadas). Un total de 60 poros por cada zona fueron observados con un microscopio de luz invertido (Eclipse TS100, Nikon, Japan, magnificación de 40 x). Empleando el programa ImageJ 1.39u (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) se midieron y promediaron el eje mayor y menor de la elipse que mejor se ajustaba a las paredes de cada poro en imágenes digitales capturadas con el programa NIS-Elements AR-Ver 4.50 Nikon. Con los promedios obtenidos se calcularon los valores de tamaño de poro, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Tamaño de poro} = 1.5 \times 2x \sqrt{\frac{a^2 + b^2}{2}}$$

Donde: a es el semieje mayor y b es el semieje menor de la elipse ajustada al poro (27). En todos los casos, los valores obtenidos se multiplicaron por 1.5 para tener en cuenta el efecto de los poros que no fueron seccionados a través de su sección transversal máxima.

5.2.1.3. Porosidad

Para determinar la porosidad, se utilizó el método de desplazamiento de líquido (47). De cada una de las dos zonas (U, M) de los soportes (NC, P1-P5) secos se cortaron muestras de 2 cm² y se pesaron (W1). Los fragmentos se sumergieron en PBS (2 mL), se desgasificaron al vacío (10 min) y se incubaron (37 °C, 24 h). Terminada la incubación, se removieron con una pinza estéril, se colocaron en un papel de filtro para eliminar el exceso de PBS y se pesaron (W2). La muestra analizada se colocó en un picnómetro vacío seco de peso conocido (W3), el picnómetro se llenó con PBS hasta completar el aforo (25 mL) y se pesó (W4). Los ensayos se repitieron cinco veces. La porosidad total se midió utilizando los pesos antes mencionados (W1, W2, W3 y W4) y la densidad (r) del PBS (1.023 g/mL), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P(\%) = 1 - \left(\frac{\rho \text{ soporte húmedo}}{\rho \text{ fibras de colágeno}} \right) \times 100$$

5.2.2. Propiedades fisicoquímicas

5.2.2.1. *Espectrometría de infrarrojo por transformada de fourier*

El análisis FTIR permite establecer el estado del colágeno luego de la manufactura del soporte. El colágeno nativo se caracteriza por la presencia de bandas de absorción en longitudes de onda específicas en el enlace vibracional de los grupo amida del colágeno (76, 77). Cada muestra seca (2 mg) de las zonas U y M de los soportes (NC, P1-P5) se mezcló con KBr (200 mg) y se comprimió para obtener un sedimento. El sistema se purgó con aire seco (1 h) para eliminar el vapor de agua del compartimento de la muestra. Los espectros se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro FT / IR-4200 (Jasco, Alemania), en un rango de 4000–500 cm^{-1} con una resolución de 8 cm^{-1} y 150 exploraciones/muestra. El colágeno usado para fabricar los soportes se utilizó como control del colágeno en estado nativo y se empleó gelatina como control del colágeno hidrolizado. Los análisis se hicieron por triplicado.

5.2.2.2. *Porcentaje de entrecruzamiento en la dispersión de colágeno*

El porcentaje de entrecruzamiento (E%) se relaciona con la velocidad de degradación del conducto y da una idea aproximada de su biodegradabilidad *in vivo* (69). Para su determinación indirecta, se empleó el reactivo nihidrina con el fin de determinar la cantidad de grupos amino libres de cada soporte de colágeno entrecruzado respecto a los soportes de colágeno no entrecruzados. Lo anterior, es posible debido a que la nihidrina forma bases de Schiff con los grupos amino libres del colágeno (27). La mezcla de reacción fue elaborada con las soluciones A y B preparadas como se describe a continuación:

- **Solución A:** 4.2 g de ácido cítrico y 1.6 g de NaOH disueltos en 100 mL de agua tipo I.
- **Solución B:** 4 g de ninhidrina disueltos en 100 mL de etilenglicol.

Para cuantificar el porcentaje de entrecruzamiento se tomaron muestras de las zonas U y M (1 cm^2) de los soportes, se pesaron (Wm), se incubaron con 500 uL de la mezcla de reacción y se calentó a 100 °C por 30 min. Después de que la mezcla se enfrió a temperatura ambiente,

se diluyó con 1mL de isopropanol 50% y se midió la absorbancia de la solución resultante con un lector de placas (TRIAD Multimode Detector, Dynex, USA) a 560nm. Para calcular el porcentaje de entrecruzamiento se aplicó la siguiente fórmula:

$$E(\%) = 100x\left(1 - \frac{\left(\frac{Am}{Wm}\right)}{\left(\frac{Ac}{Wc}\right)}\right)$$

Am = Absorbancia de la muestra (soportes P1-P5); Wm = Peso de la muestra (soportes P1-P5); Ac = Absorbancia del control (soporte no entrecruzado, NC) y Wc = Peso del control (soporte no entrecruzado, NC).

El porcentaje de grupos amino entrecruzados se calculó como la relación entre la absorbancia de los soportes P1-P5 y la de los soportes NC (soportes no entrecruzados), considerando los grupos amino libres de los soportes NC como 100%. Estos análisis se hicieron por triplicado.

5.2.2.3. *Determinación de la concentración de glutaraldehído remanente*

El glutaraldehído (GTA) es un agente químico entrecruzante usado frecuentemente porque puede reaccionar con grupos funcionales de proteínas. Aunque se ha reportado su efecto citotóxico, el entrecruzamiento del colágeno I con esta molécula mejora las propiedades mecánicas de los soportes que lo contienen (78). En este trabajo los soportes se entrecruzaron con GTA, por eso, fue necesario evaluar su contenido de glutaraldehído residual. Para este análisis, se tomaron muestras (1 cm²) de las zonas U y M de los soportes entrecruzados (P1-P5) y se incubaron (12 h, 60 °C) con 1 mL de una solución de NaOH 1 M, glicina 0.1 M y Na₂SO₃ 0.1 M con el fin de promover una reacción colorimétrica no reversible entre el bisulfito de sodio y el glutaraldehído (79). Después de centrifugar (400 × g durante 5 min) las muestras, se colocaron 100 µL del sobrenadante de cada reacción en pozos individuales de un plato de cultivo de 96 pozos. La absorbancia se leyó con un espectrofotómetro (TRIAD Multimode Detector, Dynex, USA) usando una longitud de onda de 238 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva de calibración realizada previamente con

concentraciones conocidas de glutaraldehído. Los análisis fueron llevados a cabo por triplicado.

5.2.2.4. Degradación enzimática de los soportes

Los dispositivos que van a ser injertados deben ser biodegradables para que no induzcan reacción a cuerpo extraño y para que puedan ser recambiados por nuevo tejido en la medida en que se degradan (71, 80). Por eso, en esta tesis se determinó el tiempo requerido por la enzima colagenasa tipo I para digerir totalmente los soportes, entrecruzados o no, de colágeno I. Para este ensayo se tomaron muestras (8 mm [Ø], 2 mm [H]) de las zonas U y M de todos los soportes, se pesaron (W_i), cada una de ellas se colocó en un tubo y se incubó por 24 h, 3, 15 y 30 días con colagenasa tipo I (1mL, 250UI/mL, Sigma, USA) en PBS 1x (pH 7,4; 37°C; 80 rpm en un agitador orbital). La enzima se cambió cada 5 días durante el tiempo que duró el ensayo. En cada tiempo se tomó un tubo, se centrifugó ($400 \times g$, 5 min), el sobrenadante se descartó, el soporte remanente se liofilizó (24 h) y se pesó (W_f). Para el cálculo final se promediaron los pesos obtenidos en tres ensayos diferentes; la determinación del porcentaje de degradación se hizo mediante la siguiente ecuación:

$$D(\%) = 1 - \left(\frac{W_f}{W_i}\right) \times 100$$

5.2.2.5. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es un parámetro que permite determinar las propiedades de humectación de una superficie sólida, al evaluar la tendencia de un líquido a extenderse sobre un sustrato sólido plano, químicamente inerte y no reactivo. Es una medida indirecta predictiva de la hidrofiliidad, adherencia celular y capacidad de adsorción de proteínas de un biomaterial (81). El propósito final de este trabajo fue elaborar un conducto biodegradable, de diámetro ajustable, que guiara la regeneración del nervio ciático en un modelo murino de

lesión de nervio ciático. Por eso, se determinó el ángulo de contacto de los soportes bifásicos usados para la manufactura de los seis prototipos de conductos obtenidos, empleando el método de la burbuja captiva (82). Para esto, se tomaron muestras (1 cm²) de las zonas U y M de los soportes y se colocaron en medio DMEM suplementado (24 h, temperatura ambiente) para permitir su hidratación. Cada una de las muestras hidratadas se colocó en la tapa del goniómetro empleado (Contact Angle Goniometer, Ramé-hart Instrument Co., NJ, USA) y se sumergió en DMEM. Luego, se inyectó aire (6 µL) debajo de la superficie de la muestra con el fin de formar una burbuja. Durante 120 s se capturaron 200 imágenes digitales de la burbuja formada en contacto con el soporte y se analizaron. Estos experimentos se hicieron por triplicado. La **Figura 8** muestra imágenes representativas de las burbujas y ángulos formados durante el análisis de las zonas U y M de los soportes.

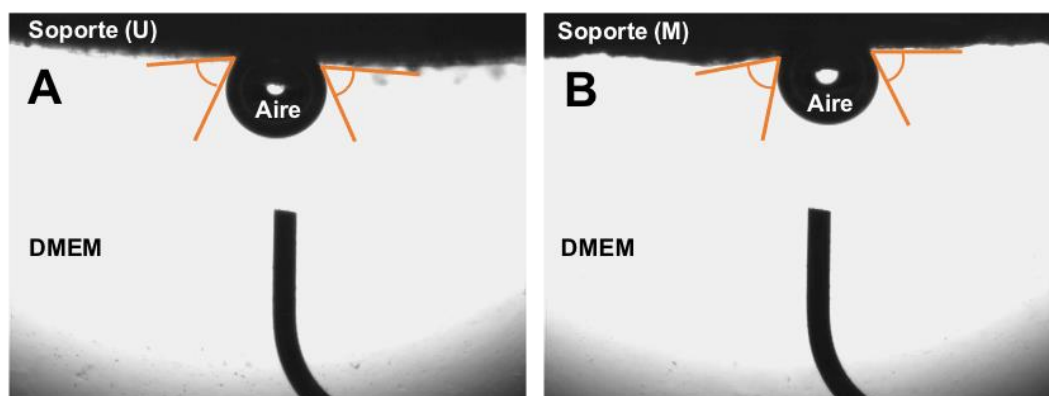


Figura 8. Método de la burbuja captiva para determinar el ángulo de contacto. La figura muestra imágenes representativas de las burbujas formadas por las zonas (A) unidireccional y (B) multidireccional de los soportes. En color naranja se representan los ángulos medidos.

5.2.2.6. *Capacidad de sorción de líquidos e hinchamiento*

La capacidad de sorción de líquidos (LSC) es una variable fisicoquímica que se debe evaluar durante la caracterización de dispositivos médicos que estarán en contacto con fluidos biológicos. En esta tesis, la capacidad de sorción de líquido de los soportes se determinó gravimétricamente. De las zonas U y M de los soportes (NC, P1-P5) se tomaron muestras (2 cm²), se pesaron (Wi) y se sumergieron en PBS 0.1M (pH 7.4) durante 24 h a 37 °C. Luego,

las muestras se retiraron con pinzas y se colocaron en una toalla de papel Whatman para remover el exceso de PBS y se pesaron (W_f). La capacidad de sorción fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$LSC(\%) = \frac{(W_f - W_i)}{W_i} \times 100$$

Para evaluar el hinchamiento de los soportes ($S\%$), se usaron las mismas muestras empleadas para los ensayos de sorción de líquido, midiendo el volumen de los soportes secos (V_d) y después de sumergirlos en PBS (V_w). Las mediciones se realizaron con un calibrador digital (Mitutoyo, Aurora, IL, USA), el porcentaje de hinchamiento se determinó con la siguiente ecuación:

$$S(\%) = \left(\frac{V_w}{V_d} \right) \times 100$$

Los experimentos para determinar los valores de sorción de líquidos e hinchamiento de las zonas U y M de los soportes P1-P5 se repitieron cinco veces.

5.2.2.7. Potencial Z

El potencial de superficie eléctrica es un parámetro fisicoquímico que impacta en la adherencia, proliferación y diferenciación de células en contacto con biomateriales, así como la adsorción y plegamiento de proteínas (83). Para la determinación del potencial Z de las zonas U y M de los soportes (NC, P1-P5), muestras de 0.2g de cada soporte se colocaron en 2 mL de PBS (20 mM, pH 7.4, 12 h) y se homogenizaron (3000 rpm por 10 min) con un ultra-turrax (IKA 3737001 T10 basic, Cole-Palmer, UK9). Por cada zona de los soportes se realizaron cinco lecturas (100 corridas cada una) a 25 °C empleando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

5.2.3. Propiedades mecánicas

5.2.3.1. *Ensayo de tracción*

El conducto nervioso debe resistir la fuerza de tensión a la que se somete el nervio en que se va a injertar, por eso, es importante evaluar este parámetro. Para el ensayo de tracción con los soportes se hicieron 6 conductos que también se denominaron NC, P1, P2, P3, P4 y P5. Para elaborar los conductos, los soportes (4cm²) se sumergieron en medio de cultivo (DMEM) durante 24 h y se plegaron desde la zona unidireccional a la multidireccional. Cada zona tenía la misma área.

Los ensayos de tracción de los conductos se realizaron con un equipo Magnetic Micro Testing System (MMT, Shimadzu), provisto con una celda de carga de 101 N, a una velocidad de 1.0 mm/min, aplicando la carga en la dirección de las fibras unidireccionales. El módulo de Young de los conductos se calculó a partir de la pendiente de las curvas de tensión-deformación. Se realizaron tres mediciones por cada muestra.

5.2.4. Propiedades biológicas

5.2.4.1. *Aislamiento, purificación y caracterización de células de Schwann*

Las células de Schwann se aislaron de nervio ciático de ratón neonato, siguiendo protocolos descritos (84). Los nervios ciáticos de 12 ratones ICR de 2-5 días de nacidos se diseccionaron y limpiaron eliminando tejido adyacente, con la ayuda de un estereoscopio. La **Figura 9**, muestra una imagen representativa de los nervios ciáticos disectados.

Para aislar las células, los nervios limpios se incubaron (40 min a 37 °C) con una mezcla de tripsina (0.25% w/v) y colagenasa tipo I (0.1% w/v) en DMEM sin suero fetal bovino (SFB). La digestión enzimática se detuvo adicionando 40% de SFB en solución balanceada de Hank's, la suspensión resultante se centrifugó (400 ×g, 10 min) y el pellet celular se

resuspendió en DMEM suplementado con SFB (10% v/v), penicilina (100 IU/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y anfotericina B (0.5 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Después de evaluar la viabilidad celular con una tinción vital (azul de tripano), se colocaron alícuotas de la suspensión celular en placas de cultivo (35 mm diámetro) pre-cubiertas con poly-L lisina y se incubó (5% CO₂, 37 °C, 24 h). A las 24 h el medio se reemplazó con DMEM suplementado con citosina-β-arabinofuranosido (10 µM), los cultivos se volvieron a incubar por 48 h y el medio se reemplazó con DMEM suplementado con heregulina β1 (10 nM) and forskolina (2 µM) (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA) (84).

Los fibroblastos contaminantes fueron eliminados por lisis mediada por complemento, siguiendo procedimientos descritos (60). Brevemente, las células se desprendieron mecánicamente con un rastrillo, se centrifugaron (400 ×g, 10 min), se resuspendieron en 60 µL de una solución de anticuerpo IgG anti- mouse Thy 1.2 (BioLegend, San Diego, CA, USA) e incubaron por 30 min a 37 °C. Luego, se adicionó el complemento de ratón y se incubó por 60 min a la misma temperatura, se lavó tres veces con PBS y se centrifugó. El pellet celular se resuspendió y las células se sembraron en DMEM suplementado con medio de inducción de células de Schwann (PDGF-AA (5ng/mL), bFGF (10 ng/mL), heregulina-β1 (10 nM) y forskolina (2 µM)) (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Cuando las células aisladas alcanzaron 80% de confluencia se caracterizaron para comprobar su identidad.



Figura 9. Nervio ciático empleado como fuente de células de Schwann. Se muestra una imagen representativa de un nervio ciático extraído de un ratón neonato.

Se empleó microscopía de fluorescencia para evaluar a las células de Schwann aisladas del nervio ciático de ratón neonato. El cultivo obtenido se digirió enzimáticamente con tripsina 0.25%-EDTA 0.025% en PBS por 3 min a 37°C y la suspensión celular resultante se centrifugó y lavó con DMEM suplementado. El pellet celular resultante se resuspendió en medio de cultivo, las células se sembraron en láminas (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™) y se dejaron adherir a la superficie de cultivo. Luego, se lavaron con solución salina balanceada de Hank's (Gibco), se fijaron con 4% vol/vol de paraformaldehído por 20 min, se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron por 20 min con Tritón X100 (0.1% v/v). Después de lavarlas nuevamente 3 veces con PBS, se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA 7.5% w/v) por 60 min a temperatura ambiente, se lavaron con BSA 1% (w/v) y se incubaron con el anticuerpo primario rabbit polyclonal IgG antibody S100b (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluido (1:50) en BSA (1% w/v) a 4 °C durante toda la noche. Finalmente, las muestras se volvieron a lavar 3 veces con PBS por 5 min, se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG H&L (FITC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluido (1:100) en BSA (1% w/v) a temperatura ambiente por 1 h y se lavaron 3 veces con PBS. Para estos experimentos se emplearon células S100b positivas de 5to o 6to pasaje.

5.2.4.2. Aislamiento, purificación y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hASC)

Las células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC) se aislaron de una muestra de lipoaspirado obtenida con consentimiento informado de una donante joven sana. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Ley 07-2015). Para establecer el cultivo primario se modificó un protocolo descrito (85). El lipoaspirado (3 g) se incubó (1 h, 37 °C) con 10 mL de colagenasa tipo I (2 mg/mL) en DMEM libre de suero. Después de la digestión, se añadió DMEM suplementado con SFB (10% v/v), y la muestra se pasó por un filtro de 70 µm. La suspensión resultante se centrifugó (300 g, 10 min) y el sedimento con las células (5×10^3 células/cm²) se colocó en DMEM suplementado con SFB (10% v/v), penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y anfotericina B (0.5 µg/mL). Los cultivos se incubaron (5% CO₂, 37 °C) cambiando medio cada tres días, hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80%. En ese momento, las células se desprendieron de la superficie del plato de cultivo (tripsina 0.25%-EDTA 0.025% en PBS), se lavaron, centrifugaron (300 x g, 10 min) y sembraron en el mismo medio de cultivo. Para ampliar la población celular los cultivos se subcultivaron tres veces usando las mismas condiciones.

Siguiendo los lineamientos de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), a las células aisladas del tejido adiposo humano se les evaluó su morfología celular, adherencia al plástico, expresión de marcadores y capacidad de diferenciación. Las características morfológicas y la adhesión de las células a la superficie de cultivo se analizaron con un microscopio invertido. Los marcadores expresados en membrana se evaluaron mediante citometría de flujo, como se describe a continuación. Luego de digerir enzimáticamente (tripsina 0.25%-EDTA 0.025% en PBS) cultivos de tercer pasaje, se colectaron células (5×10^4 células/mL) y se incubaron (30 min, 4 °C en la oscuridad) con los siguientes anticuerpos: PerCP/Cy5.5 anti-CD105 humano, FITC anti-CD90 humano, PE anti-CD73 humano, PE / Cy7 anti-CD45 humano, APC anti-CD34 humano. Finalizada la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se analizaron con un citómetro de flujo FACScantoII BD,

registrando 20.000 eventos por muestra. En la determinación de la capacidad de diferenciación se utilizaron kits StemPro™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica siguiendo las especificaciones del fabricante. Las tinciones confirmatorias de diferenciación empleadas en estos ensayos fueron aceite rojo (7 y 14 días de cultivo); azul de alciano (14 días de cultivo); fosfatasa alcalina (7 días de cultivo) y rojo de alizarina S (21 días de cultivo).

5.2.4.4. Citocompatibilidad de los soportes

La citocompatibilidad de las zonas U y M de todos los soportes fue evaluada con células de Schwann de la línea celular RSC96 (ATCC® CRL2765™), células de Schwann primarias aisladas de nervio ciático de ratones neonatos y células madre de tejido adiposo (hASC). Los tres análisis llevados a cabo fueron: citotoxicidad, proliferación y diferenciación celular.

5.2.4.4.1. Citotoxicidad celular

Para este ensayo se usaron células de Schwann de la línea celular RSC96 (ATCC® CRL2765™) y células de Schwann primarias. Siguiendo la norma ISO 10993-5 (86), las células se sembraron en placas de 96 pozos (1×10^4 células/100 μ L de medio DMEM suplementado) y se incubaron (37 °C, 5% CO₂, 24 h). Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazo con medio de extracción (DMEM preincubado durante 24 h con 1 cm² de cada soporte) y los cultivos se incubaron (37 °C, 5% CO₂) durante 24 h. Después de retirar el medio de extracción se agregaron 50 μ L de MTT (1 mg/mL) en cada cultivo, se incubó por 2 h (37 °C, 5% CO₂), se retiró el MTT, se añadió dimetil sulfóxido DMSO (100 μ L) y se midió la absorbancia con un lector de placas (TRIAD Multimode Detector, Dynex, USA) a una longitud de onda de 570 nm. Como controles positivos y negativos de citotoxicidad se usaron DMEM estéril suplementado con DMSO al 25% y DMEM incubado con 0.2 g/mL de silicona, respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

5.2.4.4.2. *Proliferación celular*

-Proliferación de células de Schwann primarias

Debido al interés de comprobar que las células de Schwann obtenidas en este trabajo se adhieren y alinean con las fibras unidireccionales de la zona U de los soportes, en este análisis solamente se incluyeron muestras (8 mm diámetro) provenientes de esta zona de todos los soportes. Las muestras de las zonas U de los soportes se sembraron con células de Schwann ($2 \times 10^5/\text{cm}^2$) y se incubaron (5% CO₂, 37 °C) durante 24 h, 7 y 14 días con DMEM suplementado con SFB 10% (v/v), antibiótico-antimicótico, solución de vitamina MEM, solución de piruvato de sodio, heregulina- β 1 (10 nM) y forskolina (2 μ M), cambiando el medio cada tres días. En cada uno de los tiempos de análisis el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo que contenía MTT (1 mg/mL) y se incubó por 3 h con agitación constante (80 rpm). El formazán producido se solubilizó con 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y la absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de 570 nm (TRIAD Multimode Detector, Dynex, USA). Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva patrón obtenida a partir de un número de células de Schwann conocidas. La distribución celular y orientación de las células en los soportes se evaluó cualitativamente en el día 14 con un trazador celular (Vybrant™ CFDA SE, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

-Proliferación y diferenciación de células hASC

Para estudiar la proliferación y diferenciación de células hASC se escogió uno de los cinco soportes elaborados, el soporte P3. Esta selección se hizo teniendo en cuenta los resultados de las pruebas mecánicas y los ensayos de citotoxicidad y de proliferación de las células primarias de Schwann. En muestras (8 mm [Ø], 2 mm [H]) de la zona U de soportes P3 se sembraron 2×10^4 hASC. Después de la siembra, las muestras se dividieron en un grupo control y un grupo incubado con medio de inducción de células de Schwann. El grupo control

se incubó (5% CO₂, 37 °C) con DMEM suplementado con SFB 10% durante 14 días cambiando medio cada tercer día. El grupo tratado se incubó (5% CO₂, 37 °C) con DMEM suplementado con β-mercaptoetanol 1 mM (medio de preinducción de células de Schwann) durante 24 h; luego de retirar el medio, las células se lavaron con PBS y se incubaron (5% CO₂, 37 °C) con medio de inducción de células de Schwann (87). El medio de inducción se cambió cada tres días y la proliferación se evaluó a los 1, 7 y 14 días (Vybrant® MTT cell proliferation kit, ThermoFisher Scientific) Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.4.4.3. Evaluación inmunohistoquímica de soportes sembrados con células de Schwann

Muestras representativas de los soportes sembrados con células de Schwann primarias ($2 \times 10^5 / \text{cm}^2$) e incubados durante 14 días se fijaron con paraformaldehído al 4% (pH 7.4; 4 °C; 24 h), se lavaron con PBS, se deshidrataron y embebieron en parafina. Los bloques se seccionaron (6 μm), se desparafinaron (60 °C) y se rehidrataron. La recuperación antigénica se realizó utilizando una solución desenmascaradora de antígeno durante 30 min. Las muestras se incubaron individualmente con anticuerpo rabbit polyclonal IgG antibody S100b (1:50) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y rabbit polyclonal IgG antibody p75^{NTR} (1: 250) (BioLegend, San Diego, CA, USA) durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron tres veces y se procesaron (Vectastain® ABC Kit peroxidasa, Rabbit IgG, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los antígenos se detectaron usando el sustrato diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) y las muestras se tiñeron con hematoxilina. Las láminas se observaron en un microscopio óptico (Nikon ECLIPSE 55i, Nikon, Tokio, Japón).

5.2.4.4.4. Evaluación por inmunofluorescencia de los soportes sembrados con células hASC

Los cultivos de *hASC* en los soportes P3 cultivados sin o con medio de inducción - descritos en 5.2.4.4.2 - se evaluaron para determinar su diferenciación a células similares a Schwann siguiendo metodología descrita (88). En el día 14 de cultivo los soportes P3 cultivados con las células se fijaron con paraformadehído 4% por 24 h, se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron con 0.1% de tritón X-100 en PBS por 20 min. Después de lavar nuevamente con PBS, las muestras se bloquearon con 1% BSA en PBS 1x por 60 min, se lavaron tres veces y se incubaron con rabbit polyclonal IgG antibody S100b (1:50) en 0.2% de BSA (toda la noche, 4°C). Al siguiente día, las muestras se lavaron tres veces con PBS, se incubaron (60 min) con Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Texas Red (4ug/mL), se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con DAPI (3uM) (4',6-diamidino-2-phenylindole) para teñir los núcleos celulares. Después de lavar tres veces con PBS, los soportes fueron observados con un microscopio invertido (Eclipse TS100, Nikon, Tokio, Japón).

5.3. Metodología objetivo 3: *Evaluar la biocompatibilidad de los conductos desarrollados como injerto de nervio periférico en un modelo murino de lesión crítica de nervio ciático.*

5.3.1. Diseño experimental animal

El propósito del estudio preclínico fue determinar si los conductos desarrollados promovían la regeneración de nervio ciático. El número de animales se estableció teniendo en cuenta las 3R's (reducción, refinamiento y reemplazo) y el mínimo necesario de ejemplares para que los resultados fueran fiables y significativos para las pruebas de eficacia y seguridad de dispositivos de esta naturaleza. Los animales utilizados fueron manipulados siguiendo las directrices ARRIVE del Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (89). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la

Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Ley 07-2015). Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por un cirujano plástico, el seguimiento clínico y sacrificio de los animales se realizó con apoyo de médicos veterinarios. En este experimento solamente se evaluaron conductos elaborados con los soportes P3.

-Técnica quirúrgica

Veintiuna ratas macho Wistar adultas (12 semanas; 250g-300 g) se dividieron en 3 grupos de 7 individuos cada uno. Cada animal se anestesió (inyección peritoneal de ketamina, 70 mg / kg; xilazina, 10 mg / kg) y al azar se eligió un muslo, se afeitó y se limpió con etanol (70%). Bajo magnificación se hizo una incisión cutánea sin afectar los músculos y mediante maniobras de divulsión en sentido de las fibras musculares se separaron cuidadosamente los tejidos conectivos adyacentes para individualizar el nervio ciático sin comprometer su irrigación sanguínea. Después de expuesto, el nervio ciático se seccionó para extraer un segmento de 10 mm (cada segmento de nervio para la resección fue medido con un molde de 10 mm para evitar errores de medición entre grupos). Una vez creado el defecto, se hicieron los siguientes tratamientos quirúrgicos:

Tratamiento I: El segmento de nervio ciático fue reemplazado por el conducto elaborado enrollando el soporte P3 prehumedecido durante 15 min con PBS.

Tratamiento II: El segmento del nervio ciático fue cortado e invertido y reimplantado (autoinjerto).

Tratamiento III: El nervio ciático lesionado se dejó sanar por segunda intención, permitiendo la retracción natural del nervio después de realizar el corte y resección del fragmento nervioso.

En los tratamientos I y II, los muñones distal y proximal y el conducto fueron posicionados realizando una neurorafia con adhesivo de fibrina (Tissel, Baxter) y con dos puntos de sutura epineural de punta redonda (ethilon 9-0). Posteriormente, en todos los grupos experimentales

se procedió al cierre de la herida quirúrgica aproximando los bordes musculares y suturando la piel con PGA reabsorbible 3.0. (**Figura 10**).

-Postquirúrgico

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con calefacción, alimento y agua *ad libitum* hasta la recuperación completa de la anestesia. Para controlar el dolor, se inyectó tramadol (5 mg/g) por vía subcutánea durante las primeras 24 h. Durante el tiempo de recuperación y el seguimiento clínico se verificó que la herida no presentara dehiscencia o infección. La evaluación del dolor, el estrés y discomfort producidos por el procedimiento quirúrgico se hizo siguiendo guías publicadas (90). También se evaluaron los signos descritos en la Guía del Consejo Nacional de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (91). El seguimiento clínico fue realizado por médicos veterinarios. Doce semanas después de la cirugía los animales fueron sacrificados.

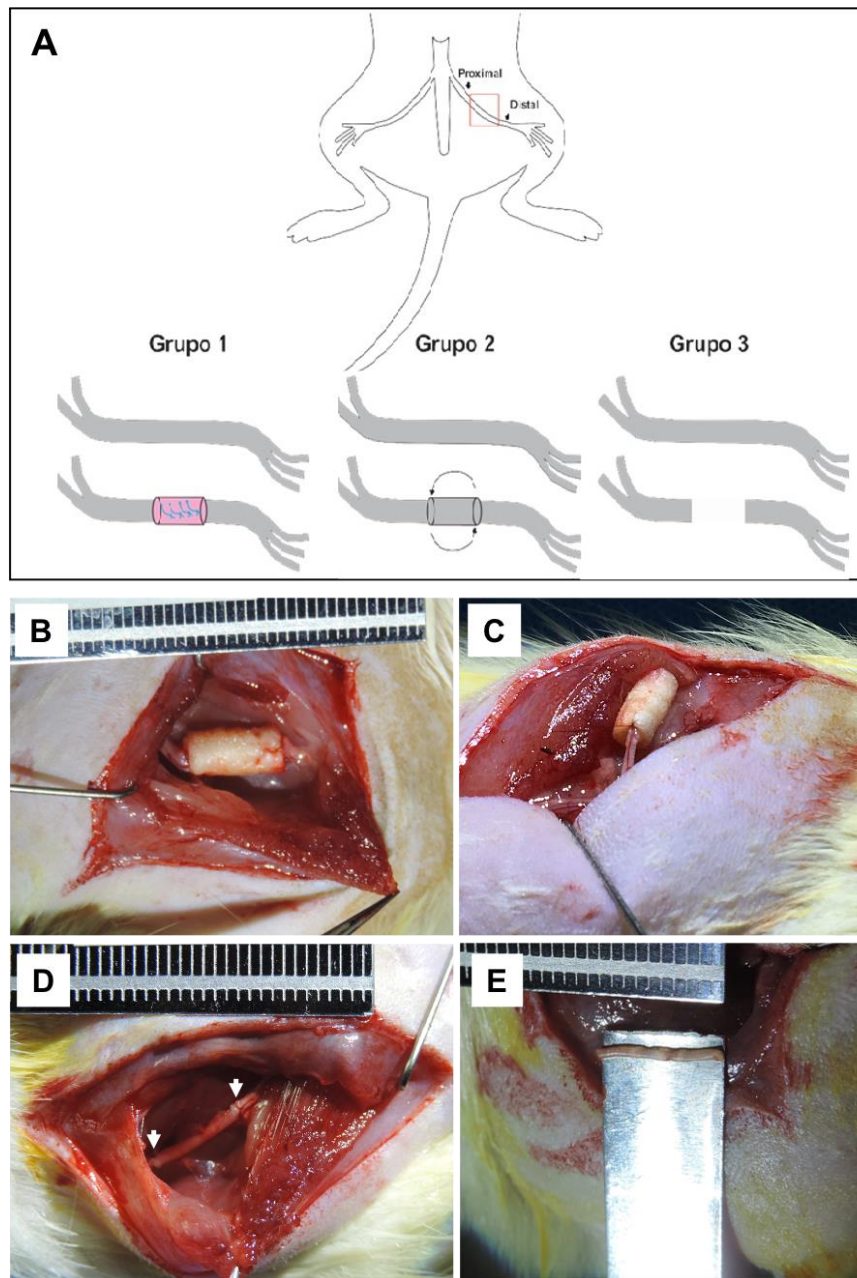


Figura 10. Experimento animal. **A.** Diagrama representativo de la organización de los grupos experimentales y tratamientos realizados. **B.** Imagen frontal del conducto P3 injertado (grupo I). **C.** Imagen lateral del injerto del conducto P3 que muestra el punto de sutura simple entre el conducto y el muñón nervioso. **D.** Imagen del autoinjerto (grupo II) que destaca los puntos de sutura (flechas blancas). **E.** Imagen del fragmento nervioso resecaado (grupo III).

5.3.2. Evaluación de la función motora del tejido nervioso reparado

La función motora se evaluó a través del ensayo de patrón de marcha en las semanas 4, 8 y 12 para calcular el índice funcional ciático (SFI). Las extremidades inferiores injertadas (E, experimento) y del lado contralateral no tratado (N, normales) de cada animal fueron sumergidas en tinta negra no tóxica, luego, las ratas fueron colocadas en una pista para caminar y las huellas fueron registradas en papel realizando dos lecturas por cada animal. El registro de las huellas fue digitalizado y la imagen digital se midió usando el programa ImageJ. Se midieron las distancias entre el talón y la punta del tercer dedo (longitud de impresión (PL, Print Length)), primero y quinto dedo (extensión del dedo del pie (TS, Toe Spread)), y cuarto al segundo dedo (extensión del dedo intermedio (ITS, Intermediary Toe Spread)). El SFI se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (92):

$$-38.3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EITS - NITS}{NITS} \right) - 8.8$$

El SFI es 0 para los animales no lesionados y -100 después de la sección completa del nervio ciático.

5.3.3. Evaluación de los nervios regenerados

Una vez sacrificados los animales, se realizaron los siguientes análisis: relación de masa muscular, evaluación histológica cualitativa del músculo gastrocnemio, densidad axonal, diámetro y grosor de la vaina de mielina:

5.3.3.1. Relación de masa muscular y evaluación histológica del músculo

En todos los grupos se diseccionó el músculo gastrocnemio para evaluar la relación de la masa muscular del lado lesionado (W_i) y del lado contralateral sano (W_h). Los músculos gastrocnemio diseccionados se fijaron con paraformaldehído (4%, 24 h) y después de

eliminar el exceso de paraformaldehído con papel Whatman®, se pesaron para determinar la relación W_i / W_h (93).

Para la evaluación histológica de la atrofia muscular, se cortaron fragmentos del músculo gastrocnemio (5-8 mm), se deshidrataron usando concentraciones ascendentes de etanol (20%- 100%) y xileno. Las muestras se incluyeron en parafina y los bloques se procesaron con un micrótopo para obtener cortes transversales (5 μm). Luego de desparafinar con calor, xileno y concentraciones descendentes de etanol las láminas se tiñeron con Tricrómico de Masson. Las secciones se observaron bajo el microscopio óptico (Olympus BX51).

5.3.3.2. Análisis histomorfométrico de los nervios (densidad axonal, diámetro y espesor de la vaina de mielina)

Para el análisis histomorfométrico, los nervios se fijaron con glutaraldehído (4%, 24 h) y las áreas del nervio cercanas al sitio de coaptación distal se cortaron transversalmente en secciones delgadas (1mm). El nervio contralateral no lesionado sirvió como control del nervio normal. Las secciones se fijaron con tetróxido de osmio (1%, 2 h), se deshidrataron, se embebieron en resina Epon y los bloques se procesaron para obtener secciones semi-finas de 1 μm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 1% (94). Las imágenes se capturaron en una magnificación de 100 x, se digitalizaron y analizaron con el programa ImageJ evaluado en cada grupo la densidad axonal, el diámetro de los axones y el grosor de la vaina de mielina. En cada muestra evaluada, se hicieron 3 cortes de la zona distal del nervio y en cada uno de ellos se contaron y midieron el total de axones/ mm^2 presentes en todo el campo visual. El conteo se realizó por triplicado (**Figura 11**).

Adicionalmente, los nervios elegidos al azar de cada grupo se fijaron con paraformaldehído (4%), se lavaron, se incrustaron en Cryomatrix™ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), se congelaron y se cortaron longitudinalmente (5 μm) con un criostato. Las muestras se observaron con microscopía de fluorescencia (100 x) (Olympus BX51) a una longitud de

onda de 495 nm para visualizar la disposición longitudinal de las fibras de los axones reparados.

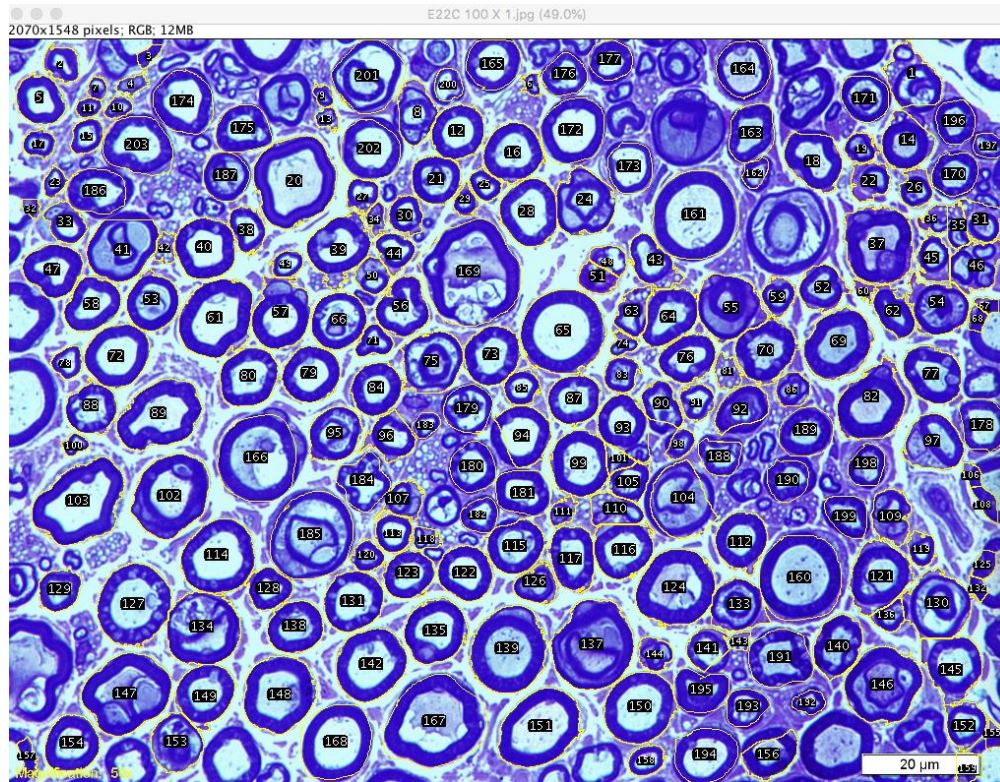


Figura 11. Análisis histomorfométrico. La imagen presenta un corte de la zona distal del nervio ciático después de 12 semanas de realizada la cirugía. Se muestran los axones numerados que se contaron con el programa ImageJ.

5.3.4. Consideraciones éticas del manejo animal y residuos biológicos

En el planteamiento de este proyecto se minimizó al máximo el número de animales que se usaron como fuente de las células de Schwann y en el experimento animal. Para la obtención de las células de Schwann, se emplearon 2 camadas de 6 ratones ICR de 2 a 5 días de edad según lo descrito en los protocolos establecidos en capítulo 5 "Primary Schwann Cell Cultures" del libro "Protocols for Neural Cell Culture"(60). El sacrificio de los animales para este estudio fue realizado por médicos veterinarios siguiendo las recomendaciones establecidas por la Sociedad Americana de Médicos Veterinarios en el reporte de eutanasia "Report of the AVMA Panel on Eutanasia"(95).

5.3.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos *in vitro* se hicieron por triplicado o 5 veces dependiendo del experimento, de manera controlada y en unidades experimentales aleatorizadas. Para el ensayo experimental animal, se realizó un experimento controlado, aleatorizado y en paralelo, con un grupo de exposición y dos grupos control (tratamiento estándar (autoinjerto) y sin tratamiento). Los datos cuantitativos se muestran como la media \pm la desviación estándar. Se utilizó una prueba ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre los grupos, las cuales fueron significativas cuando $p < 0.05$ o $p < 0.01$, se empleó el programa OriginLab para los análisis estadísticos.

6. Resultados

6.1. Resultados objetivo específico 1: *Elaborar conductos de colágeno tipo I con dos fases de diferente orientación de poro (unidireccional y multidireccional) y estructura tubular plegable.*

6.1.1. Apariencia macroscópica de los soportes

En la fase inicial de este proyecto se elaboraron 6 prototipos de soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I denominados NC, P1, P2, P3, P4 y P5. La apariencia de estos se evaluó con ayuda de un estereoscopio. En la **Figura 12** se muestra una imagen representativa del prototipo P3 y del conducto que resulta de su plegamiento. Se observa un soporte laminar constituido por dos zonas continuas con diferentes orientaciones de poros (**Figura 12 A**). El soporte humedecido con DMEM se plegó de la zona U a la zona M para obtener un conducto que en su interior contiene matriz con canales aparentemente unidireccionales y con un diámetro aproximado de 2 mm (**Figura 12 B**). La longitud del conducto obtenido al plegar el soporte (2 cm^2) fue aproximadamente 4 cm (**Figura 12 C**).

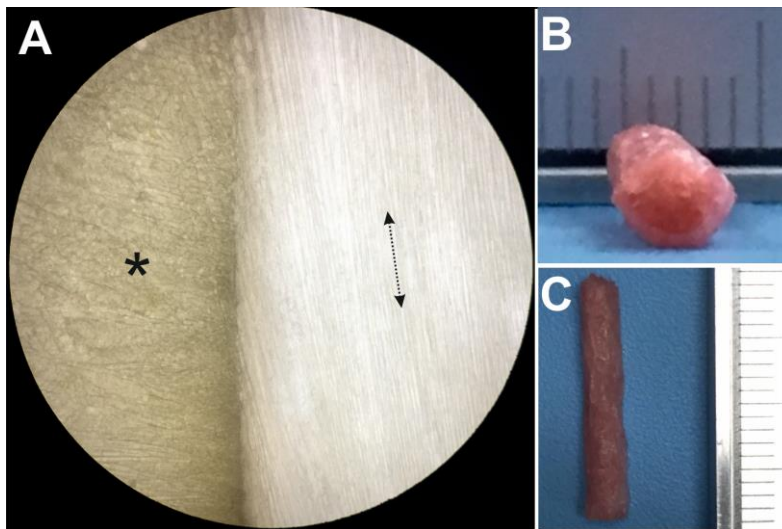


Figura 12. Evaluación macroscópica de un soporte laminar bifásico de colágeno tipo I y el conducto que resulta de su plegamiento. **A.** Imagen estereoscópica del soporte P3. **B.** Imagen transversal del conducto elaborado con P3 humedecido con DMEM. **C.** Imagen completa de un conducto elaborado al plegar una soporte de 2 cm^2 . *:zona M; flecha vertical: zona U.

Aunque en la **Figura 12** se muestra un soporte laminar bifásico circular, en este se trabajo se elaboraron soportes laminares bifásicos con áreas de 10 cm², los cuales se cortaron para obtener los soportes requeridos para cada experimento. La **Figura 13 A** presenta un soporte bifásico de 1 cm². En las **Figuras 13B-D** se muestra la secuencia de imágenes del plegamiento del soporte humedecido desde la zona U a la zona M, así como, la del conducto resultante. En la **Figura 13 E** se observan conductos elaborados con diámetros diferentes.

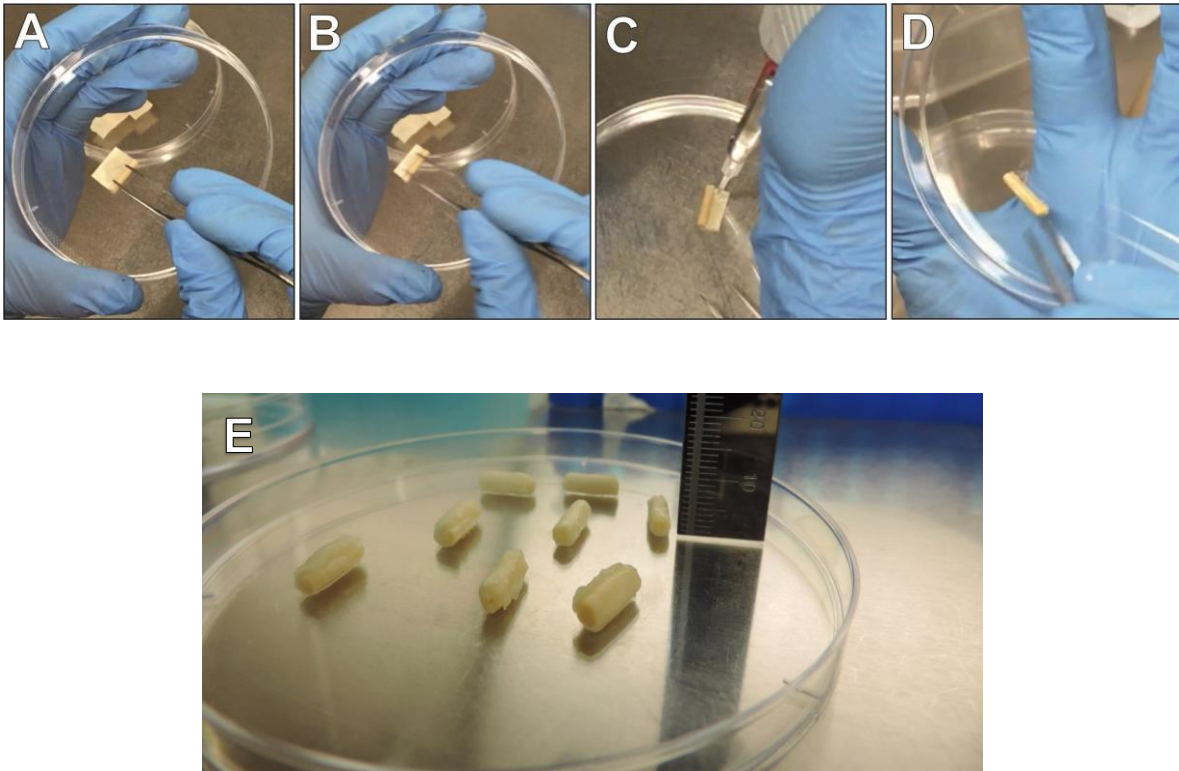


Figura 13. Soporte bifásico laminar de colágeno tipo I y formación de un conducto nervioso. **A-D.** Secuencia del plegamiento del soporte. **E.** Conductos enrollados con diámetros diferentes.

6.2. Resultados objetivo específico 2: *Determinar las propiedades fisicoquímicas, microestructurales, mecánicas y biológicas de los conductos desarrollados.*

En esta sección se presentan los resultados de la caracterización de los seis prototipos de soportes bifásicos que se desarrollaron. También, la caracterización mecánica de los

conductos elaborados con estos soportes y la evaluación biológica *in vitro* del conducto elaborado con el soporte P3.

6.2.1. Evaluación microestructural de los soportes elaborados

6.2.1.1. Apariencia microestructural de los soportes por microscopía electrónica de barrido (ESEM)

La determinación de las características microestructurales de los soportes se hizo con el fin de demostrar la orientación de los poros y/o canales que se formaron. La **Figura 14** muestra imágenes ESEM representativas de las zonas U y M de todos los soportes. Las secciones longitudinales evidenciaron claramente la presencia de dos zonas continuas con direccionalidades diferentes (U y M), así como, la interfase formada entre ellas (**Figura 14 A**). Los cortes transversales confirman la existencia de dos zonas con poros orientados diferencialmente y la interfase de las dos (**Figura 14 B**). Todas las secciones transversales de los soportes presentaron poros bien definidos en la zona U, aparentemente, de mayor tamaño que los de las zonas M. Esta última zona aparentemente es más densa y compacta que la zona U (**Figura 14 B**). La vista ampliada de las secciones transversales de la zona M de todos los soportes mostró poros heterogéneos, con interconectividad y tamaño de poro variable (**Figura 14 C**). La vista ampliada de las zonas U mostró poros más homogéneos que los observados en la zona M (**Figura 14 D**). Las zonas U de todos los soportes evaluados mostraron la formación de canales continuos y paralelos entre sí (**Figura 14 E**).

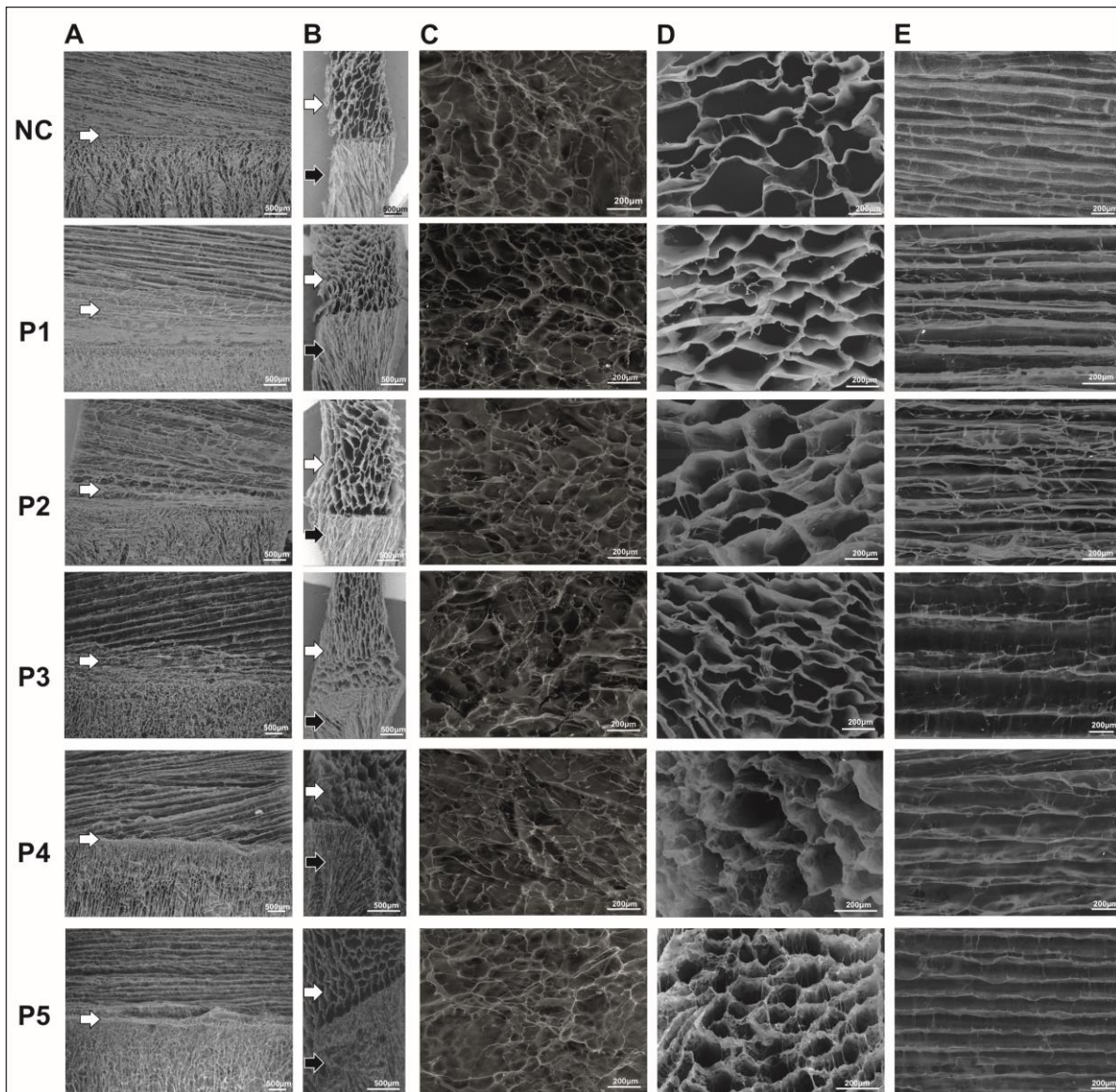


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de los soportes laminares bifásicos. **A.** Corte longitudinal de los soportes que muestra una zona unidireccional y una multidireccional continuas, con una interfase entre ellas (flecha blanca). **B.** Corte transversal del soporte, la flecha blanca señala a la zona U y la flecha negra señala a la zona M. **C.** Magnificación del corte transversal la zona M. **D.** Magnificación del corte transversal de la zona U. **E.** Magnificación del corte longitudinal de la zona U. **NC:** soporte no entrecruzado. **P1-P5:** soportes entrecruzados con glutaraldehído.

6.2.1.2. Tamaño de poro y porosidad

El tamaño de poro y la porosidad de los soportes impactan su interacción con las células. En este trabajo el tamaño de poro se evaluó solamente en los soportes entrecruzados, debido a la baja estabilidad estructural de los soportes no entrecruzados (NC). La **Figura 15** indica que la dispersión del tamaño de poro fue mayor en las zonas M que en las zonas U de todos los soportes. El rango de valores para el tamaño de poro de las zonas M de todos los soportes fue de 100 a 500 μm con un promedio de $286.6 \pm 129 \mu\text{m}$ (**Figura 15 A**), mientras que el rango de la zona U de todos los soportes fue de 100 a 400 μm con un promedio de $211.3 \pm 100 \mu\text{m}$ (**Figura 15 B**). Además, las diferencias entre el tamaño promedio de los poros de las zonas M y U fueron significativas ($p = 0.00269 \times 10^{-6}$).

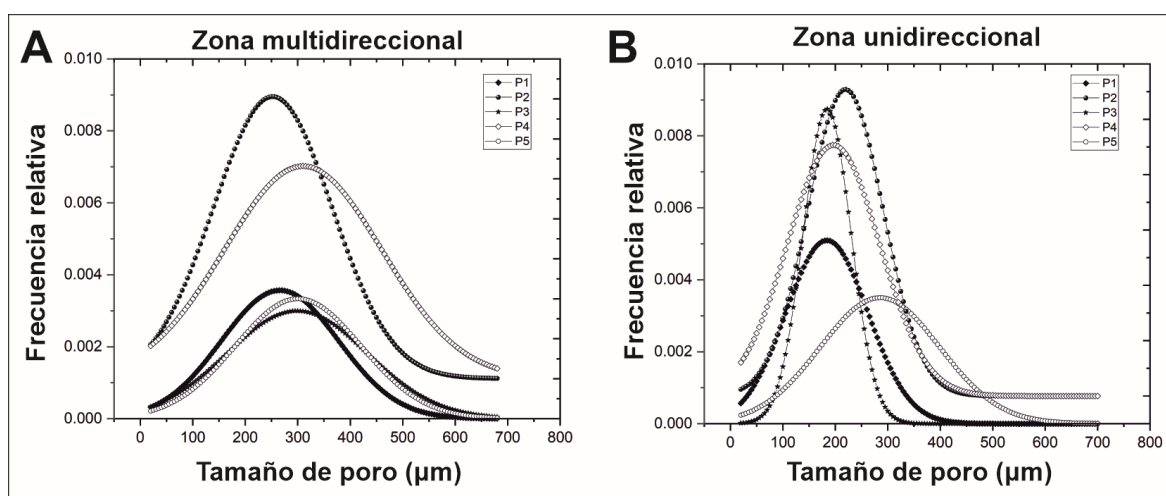


Figura 15. Distribución del tamaño de poro. **A.** Zona multidireccional. **B.** Zona unidireccional. **P1-P5:** soportes entrecruzados con glutaraldehído.

La **Figura 16** presenta los datos de la determinación de la porosidad. Las dos zonas de los soportes son muy porosas, sin embargo, la porosidad, aunque no significativamente diferente, fue mayor en las zonas M ($> 90\%$) que en las zonas U ($> 80\%$). La porosidad no se vio afectada por la concentración del agente entrecruzante y fue similar en todos los prototipos NC-P1-P5.

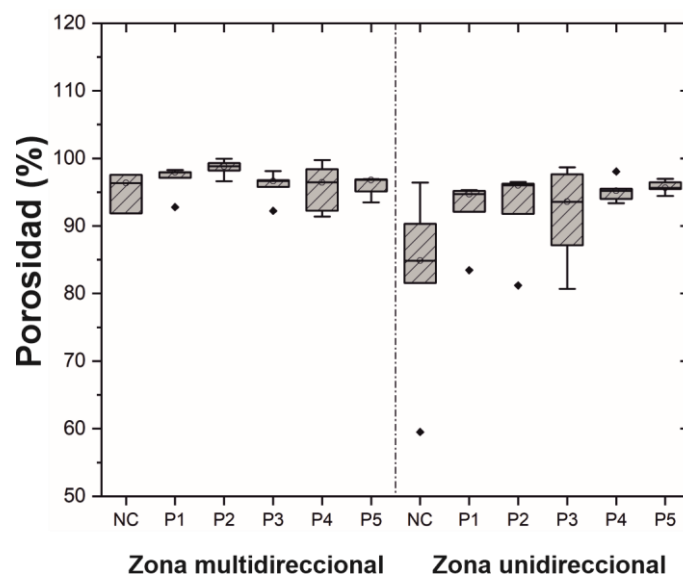


Figura 16. Porosidad de los soportes bidimensionales de colágeno tipo I. Se muestra un Diagrama Boxplot elaborado con los datos de la porosidad encontrada en las zonas multidireccional y unidireccional de los soportes. **NC:** soporte no entrecruzado, **P1-P5:** soportes entrecruzados.

6.2.2. Propiedades fisicoquímicas de los soportes desarrollados

6.2.2.1. FTIR de los soportes desarrollados

Los espectros infrarrojos de todos los soportes exhibieron señales características del colágeno tipo I tanto en las zonas M como en las zonas U (**Figura 17 A y B**), lo cual, confirma que el proceso de fabricación de los soportes no desnaturaliza al colágeno nativo. Los picos de absorbancia observados en los soportes son similares a los espectros del colágeno nativo usado como control (C). Las bandas detectadas en los espectros infrarrojos fueron: amida-A (estiramiento N-H) en 3334 cm^{-1} (zonas M) y en 3307 cm^{-1} (zonas U); amida-I (estiramiento C=O) en $\approx 1660\text{ cm}^{-1}$ (zonas M) y 1654 cm^{-1} (zonas U); amida-II (estiramiento CN, combinación de flexión NH) a $\approx 1557\text{ cm}^{-1}$ (zonas M) y 1551 cm^{-1} (zonas U), amida-III (estiramiento CN, flexión NH, estiramiento CC) a $\approx 1239\text{ cm}^{-1}$ para ambas zonas. Por el contrario, el espectro infrarrojo del colágeno desnaturalizado (gelatina) fue diferente.

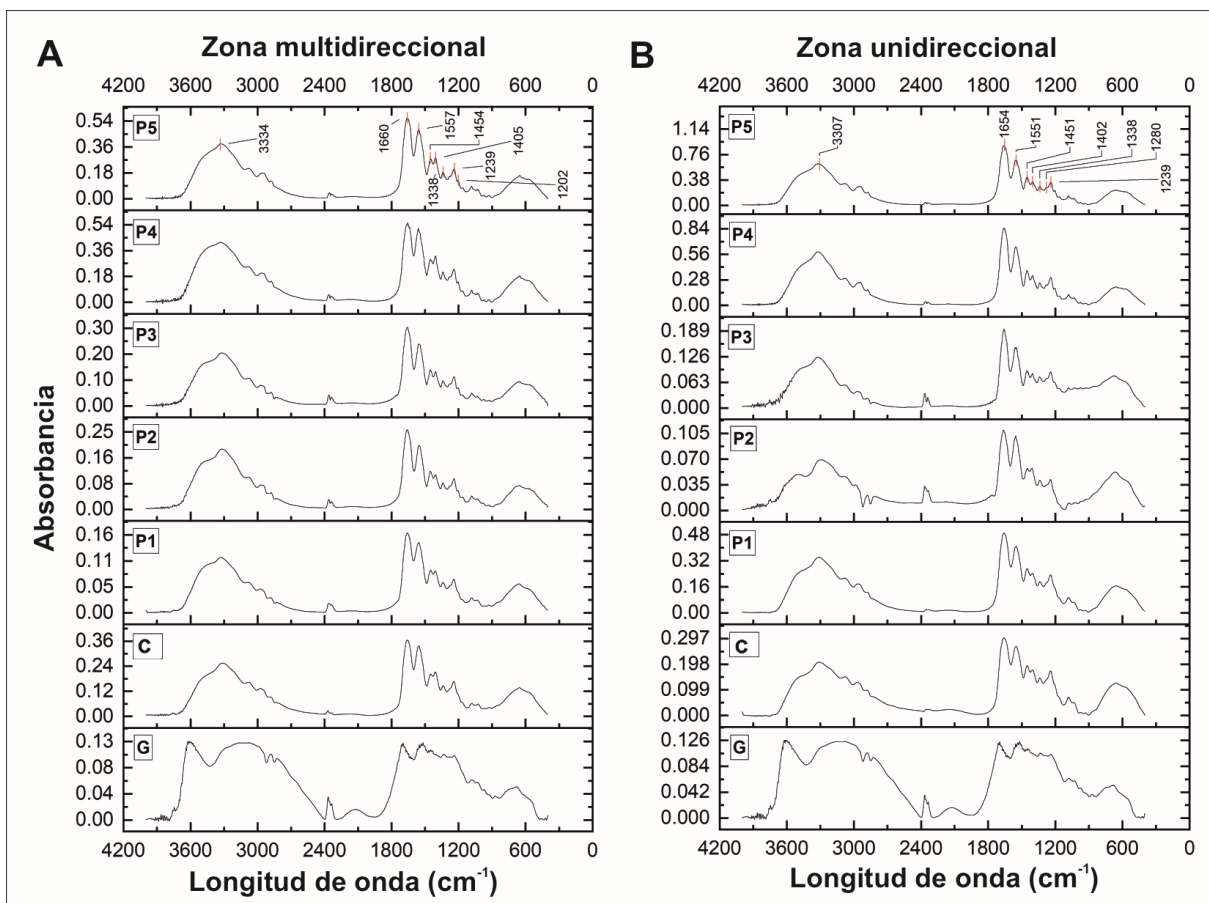


Figura 17. Espectro FTIR de los soportes de colágeno elaborados. **A.** Espectros FTIR de la zona M. **B.** Espectros FTIR de la zona U. **P1-P5:** soportes entrecruzados. **C:** colágeno nativo. **G:** gelatina

6.2.2.2. Porcentaje de entrecruzamiento, glutaraldehído residual y degradación de los soportes.

El entrecruzamiento de las fibras de colágeno de los soportes es mediado por las reacciones entre sus grupos amino libre y los grupos carbonilo del glutaraldehído. Por eso, este parámetro disminuye al aumentar los grupos amino libres en el soporte (96). La determinación del porcentaje de entrecruzamiento de los soportes se hizo indirectamente, cuantificando los grupos amino libres presentes en cada soporte. Se encontró que las zonas U (elaboradas con 5mg/g) de los soportes P1 y P2 entrecruzados con glutaraldehído al 0.02% v/v y 0.04% v/v, respectivamente, tuvieron mayor porcentaje de entrecruzamiento que las zonas M elaboradas con 8mg/g y entrecruzadas con las mismas concentraciones de

glutaraldehído ($p < 0.05$) (**Figura 18 A**). Cuando se utilizó glutaraldehído al 0.06, 0.08 y 0.1% v/v (P3-P5), no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de entrecruzamiento de las zonas U y M de los soportes ($p > 0.05$). La comparación de las zonas U o de las zonas M de los soportes de los prototipos P3-P5 no mostró diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). El porcentaje de entrecruzamiento de las zonas U y M de estos soportes fue superior al 80%.

En los soportes entrecruzados se determinó el glutaraldehído residual debido a que el glutaraldehído puede ser citotóxico. Se encontró que los residuos de glutaraldehído aumentan al incrementar la concentración empleada para el entrecruzamiento. En las zonas M de los soportes P1 y P2 no se detectaron residuos del agente entrecruzante, sin embargo, en los soportes de los prototipos P3-P5 se observó que el glutaraldehído residual fue mayor en las zonas U que en las zonas M. No obstante, cuando se encontraron residuos de este compuesto su concentración fue menor a 6.0×10^{-4} mg de glutaraldehído/mg de soporte (**Figura 18 B**).

Un conducto injertado en un nervio periférico seccionado debe ser biodegradable para que pueda ser remplazado por tejido nervioso sintetizado de *novo* y para que no induzca reacción a cuerpo extraño (14). Las **Figuras 18 C y D** muestran el porcentaje de degradación de las zonas M y U de los soportes de los prototipos desarrollados. Las dos zonas de los soportes NC se degradaron completamente después de 24 h de digestión enzimática. Contrariamente, los soportes P1 y P2 fueron más resistentes, ya que sus zonas M y la zona U de los soportes P1 solo se degradaron totalmente a los 30 días. El porcentaje de degradación de la zona M de los soportes P3-P5 en el día 30 fue de 65 % (P-3) y 45% (P4-P5) y la degradación de la zona U fue de 50% (P3) y 45% (P4-P5). En general, los datos indican que las zonas U de los soportes P3-P5 se degradaron menos que las zonas M a los 30 días, además, que esta degradación disminuye cuando la concentración de agente entrecruzante aumenta.

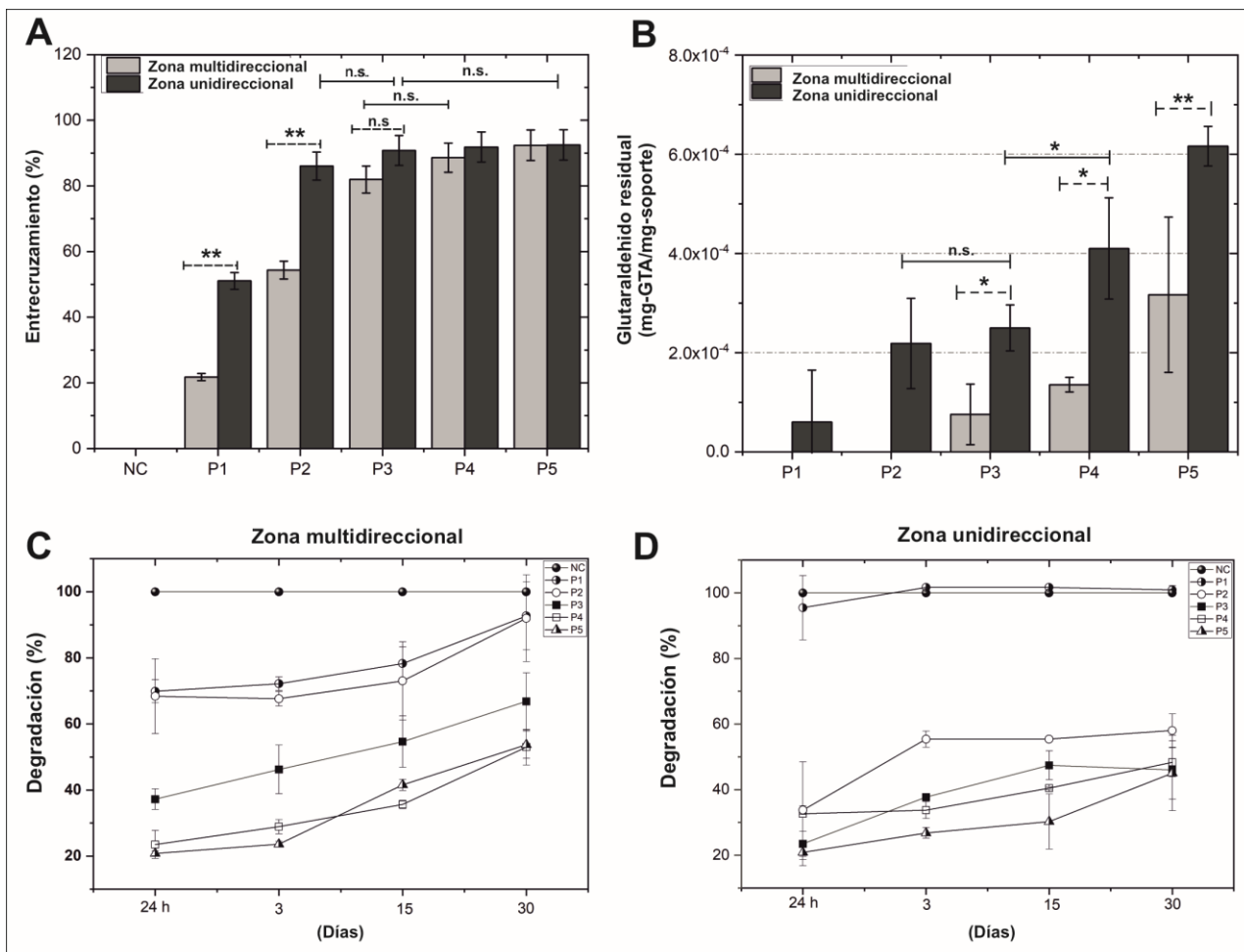


Figura 18. Porcentaje de entrecruzamiento, glutaraldehído residual y degradación de los soportes. **A.** Porcentaje de entrecruzamiento. **B.** Glutaraldehído residual. **C.** Degradación de los soportes en la zona M. **D.** Degradación de los soportes en la zona U. Diferencias significativas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s.: $p > 0.05$.

6.2.2.3. Capacidad de sorción de agua, hinchamiento, ángulo de contacto y potencial Z.

Cuando los conductos para regeneración nerviosa guiada se utilizan como injerto, interactúan con el ambiente acuoso de los tejidos. Por eso, es importante determinar cuánto líquido sorben, su hinchamiento y su ángulo de contacto (14). También, es importante conocer la carga eléctrica de la superficie porque ella impacta la adhesión de las células a las fibras del soporte que forma el conducto (83). La **Tabla 3** muestra los resultados de la evaluación de la capacidad de sorción de líquido, hinchamiento, ángulo de contacto y potencial Zeta (ζ) de

las zonas M y U de todos los soportes. La capacidad de sorción de líquido fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en las zonas M que en las zonas U de todos los soportes, también fue mayor en los soportes entrecruzados (P1-P5) que en los soportes no entrecruzados (NC). Este parámetro no varió con la concentración de glutaraldehído porque no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los soportes P1-P5. El porcentaje de hinchamiento de los soportes P1-P5 en ambas zonas fue mayor que en los soportes NC y no se presentaron diferencias significativas entre las zonas M y U de los soportes P1-P5. La evaluación del ángulo de contacto mostró valores superiores a 50° e inferiores a 90° . No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las zonas M y U de los soportes.

Tabla 3. Capacidad de sorción de líquido, hinchamiento, ángulo de contacto y potencial Zeta (ζ) de los soportes NC y P1-P5 (zonas M y U).

	Zona Multidireccional					
	NC	P1	P2	P3	P4	P5
Capacidad de sorción de líquido (%) *	2288.2±433.3	5803.6±210.1	5662.2±340.0	5184.9±200.1	5688.3±118.9	5035.0±213.0
Hinchamiento (%)*	39.9±9.9	108.0±5.1	115.6±10.0	109.1±9.6	103.8±3.7	108.18±16.85
Ángulo de contacto	63.9±4.8	53.4±0.9	62.3±9.6	76.5±6.6	70.04±6.3	72.30±7.9
Potencial Z (mV)	9.5±1.0	7.0±1.9	0.8±2.0	-0.8±1.0	-0.1±1.2	-1.3±1.6
	Zona Unidireccional					
	NC	P1	P2	P3	P4	P5
Capacidad de sorción de líquido (%) *	20.3±4.3	56.0±5.6	62.1±5.2	60.9±4.9	61.8±5.8	60.1±7.9
Hinchamiento (%) *	31.2±8.2	94.2±12.0	111.3±11.1	96.5±11.6	115.1±10.1	99.1±7.9
Ángulo de contacto	62.9±9.1	50.0±9.2	76.58±12.16	73.3±9.7	81.7±8.6	72.3±6.8
Potencial Z (mV)	9.8±0.3	8.3±0.7	1.3±2.0	1.1±1.0	3.8±1.2	1.3±0.6

*No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las zonas M de los soportes P1 a P5 y entre las zonas U de los soportes P1-P5.

El potencial Zeta (ζ) en ambas zonas de los soportes NC fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los soportes entrecruzados. En los soportes entrecruzados este parámetro fue mayor en las zonas M y U de P1 que en los soportes P2, P3, P4 y P5. Los valores negativos solo se observaron en las zonas M de P3-P5, y no hubo diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). En la zona M de los soportes P2-P5 el potencial Z fue significativamente menor

que en la zona U ($p < 0.05$). En general el potencial Z disminuyó al aumentar el entrecruzamiento de los soportes.

6.2.3. Propiedades mecánicas de los conductos desarrollados

La evaluación de los experimentos de tensión-deformación en el ensayo de tracción realizado con los conductos preparados con los soportes P1-P5, indicó que el módulo elástico (módulo de Young) aumenta al aumentar el entrecruzamiento de los soportes. Los valores del módulo de Young de los soportes NC (0.027 MPa), P1 (0.064 MPa) y P2 (0.230 MPa) no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) mientras que los módulos de P3 (0.437 MPa), P4 (0.876 MPa) y P5 (0.983 MPa) fueron significativamente ($p > 0.05$) mayores que los de NC, P1 y P2 (**Figura 19**).

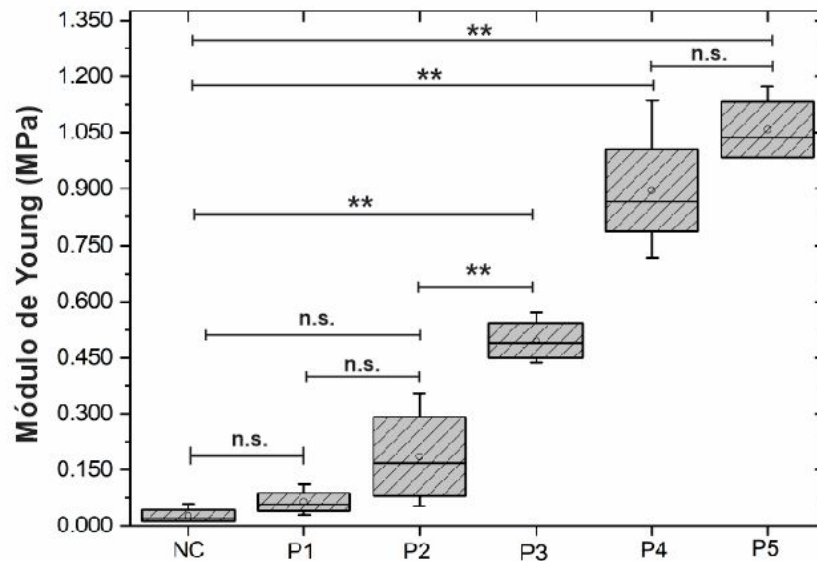


Figura 19. Módulo elástico de los conductos desarrollados. Diferencias significativas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s.: $p > 0.05$.

6.2.4. Evaluación biológica *in vitro* de los soportes desarrollados

6.2.4.1. Evaluación microscópica y caracterización de las células de Schwann aisladas de nervio ciático de ratones neonatos.

La **Figura 20** muestra una imagen representativa de los cultivos primarios de células de Schwann. En las imágenes obtenidas con microscopía de luz se observan células fusiformes, altamente refringentes y con prolongaciones en forma de aguja (**Figura 20 A, B**). En la imagen obtenidas con microscopía de fluorescencia, claramente se aprecian células fusiformes positivas para S100b (**Figura 20 C**).

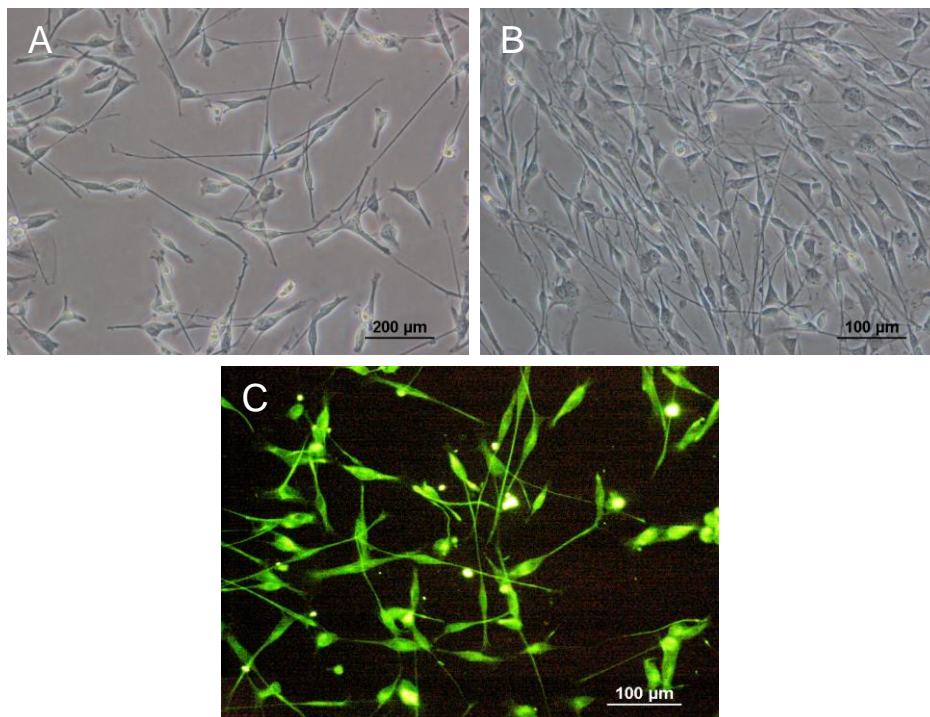


Figura 20. Células de Schwann aisladas de nervio ciático de ratones neonatos. **A.** Cultivo primario. **B.** Subcultivo de 5^{to} pasaje. **C.** Cultivo primario de células inmunomarcadas con anticuerpo anti S100b.

6.2.4.2. Aislamiento y diferenciación de células madre adiposas humanas (hASC)

La caracterización de las células aisladas de lipoaspirados humanos obtenidos con consentimiento informado, mostró que cumplen con los criterios mínimos establecidos para las células estromales mesenquimales multipotentes (97). Los resultados de la citometría de flujo indicaron que estas células son positivas alto para los marcadores CD73, CD90 y CD105 alto (99.8%; 99.1%; y 71.8%, respectivamente) y positivas bajo para CD34 y CD45 (2.5% y 5.1%, respectivamente) (**Figura 21 A-E**).

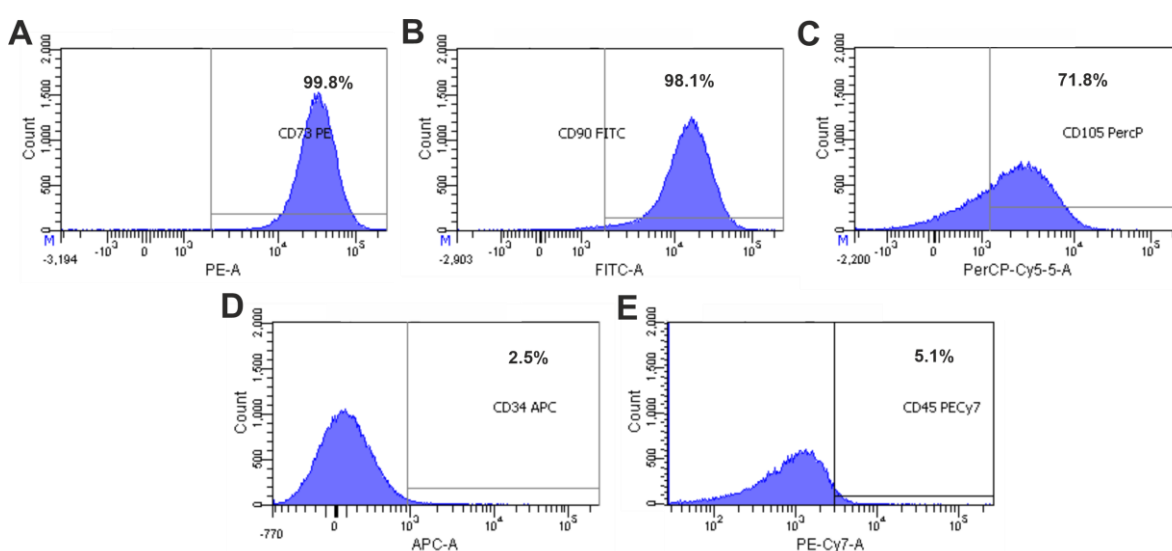


Figura 21. Citometría de flujo de las células madre mesenquimales de tejido adiposo de tercer pasaje. **A.** PE anti-CD73 humano (positivo alto 99.8%). **B.** FITC anti-CD90 humano (positivo alto 99.1%). **C.** PerCP/Cy5.5 anti-CD105 humano (positivo alto 71.8%). **D.** APC anti-CD34 humano (positivo bajo 2.5%). **E.** PE / Cy7 anti-CD45 humano (positivo bajo 5.1%).

En la **Figura 22** se muestran los resultados de los ensayos de diferenciación realizados con las células provenientes de lipoaspirado humano. La evaluación con microscopio invertido de luz revela la presencia de células fusiformes adheridas a las placas cultivo (**Figura 22 A**), que al ser inducidas a la diferenciación adipogénica exhiben vacuolas lipídicas teñidas con aceite rojo después de 7 días de cultivo (**Figura 22 B**). Los cultivos incubados durante 14 días con el kit de diferenciación condrogénica tiñeron positivo para azul de alciano (**Figura 22 C**). Adicionalmente, los cultivos inducidos a la diferenciación osteogénica fueron

positivos para fosfatasa alcalina al séptimo día y evidenciaron la formación de depósitos de calcio al ser teñidos con rojo de alizarina después de 21 días de cultivo (**Figura 22 D-E**).

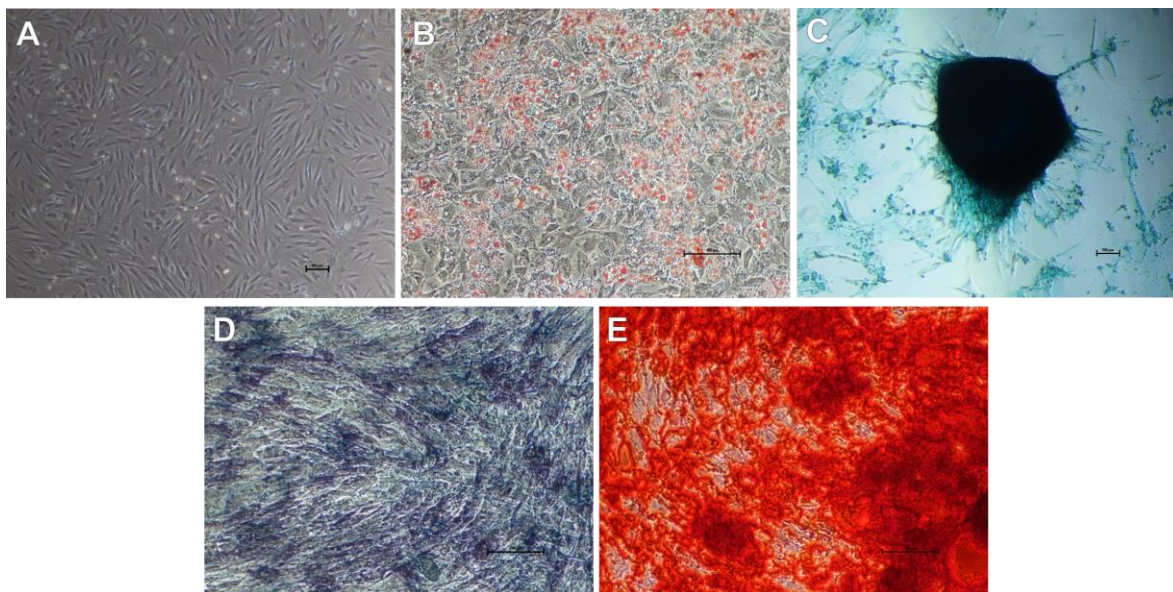


Figura 22. Ensayos de diferenciación de células madre mesenquimales humanas (*hASC*) en cultivo. **A.** Células adheridas a la superficie de poliestireno de los platos de cultivo. **B.** Células que evidencian la formación de vacuolas lipídicas con rojo de alizarina. **C.** Aglomerado celular positivo para la azul de alciano. **D.** Células positivas para fosfatasa alcalina (APL). **E.** Depósitos de calcio evidenciados a los 21 días de cultivo con rojo de alizarina.

6.2.4.3. Evaluación de la citocompatibilidad: citotoxicidad, proliferación y diferenciación celular.

Los ensayos de citotoxicidad, proliferación y diferenciación celular se realizaron para demostrar *in vitro* la citocompatibilidad de los soportes. Como se mencionó en la “Metodología” en la evaluación de la citotoxicidad de los soportes se usaron la línea celular de células de Schwann RSC96 y células de Schwann primarias. Las células RSC96 incubadas con los extractos de todos los soportes mostraron porcentajes de viabilidad superiores al 70% (**Figura 23 A**). Las células de Schwann primarias incubadas con los extractos de los soportes NC y P1-P3 también mostraron porcentajes de viabilidad superiores al 70%, mientras que las incubadas con los extractos de P4 y P5 mostraron porcentajes de viabilidad inferiores al 60% (**Figura 23 B**).

Con el fin de determinar si las células Schwann primarias se adherían y proliferaban en la zona U de los soportes se hicieron ensayos de proliferación. Los resultados muestran que en el día 7 de cultivo la proliferación de las células en los soportes P1, P2 y P3 fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los soportes P4 y P5. También, que no se encontraron diferencias significativas entre P1, P2 y P3 ($p > 0.05$). El número de células en los soportes P1, P2 y P3 no fue significativamente diferente a el número de células del día 7 ($p = 0.078$; $p = 0.69$; $p = 0.58$, respectivamente) en el día 14. Además, se encontraron diferencias significativas en el número de células de los soportes P4 y P5 en los días 7 y 14 (**Figura 23 C**).

Debido a que el conducto que se injerta en una lesión de nervio periférico debe ser reconocido por células madre mesenquimales - presentes en el sitio de la lesión - para adherirse, proliferar y diferenciarse se evaluó la proliferación de hASC sembradas en el soporte P3 en ausencia o presencia del medio de inducción de células de Schwann. Este soporte se escogió porque fue el único que estaba parcialmente degradado a los 30 días y porque en los ensayos de citotoxicidad la viabilidad de las células RSC96 y de las células de Schwann primarias fue mayor al 70%. La proliferación de hASC primarias fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los cultivos incubados con el medio de inducción de células de Schwann que en los cultivos incubados sin este medio. Al comparar el número de hASC cultivadas con el medio de inducción en los días del ensayo, se encontró que este fue significativamente ($p = 1.9 \times 10^{-6}$) mayor en el día 14 que en los días 3 y 7 (**Figura 23 D**).

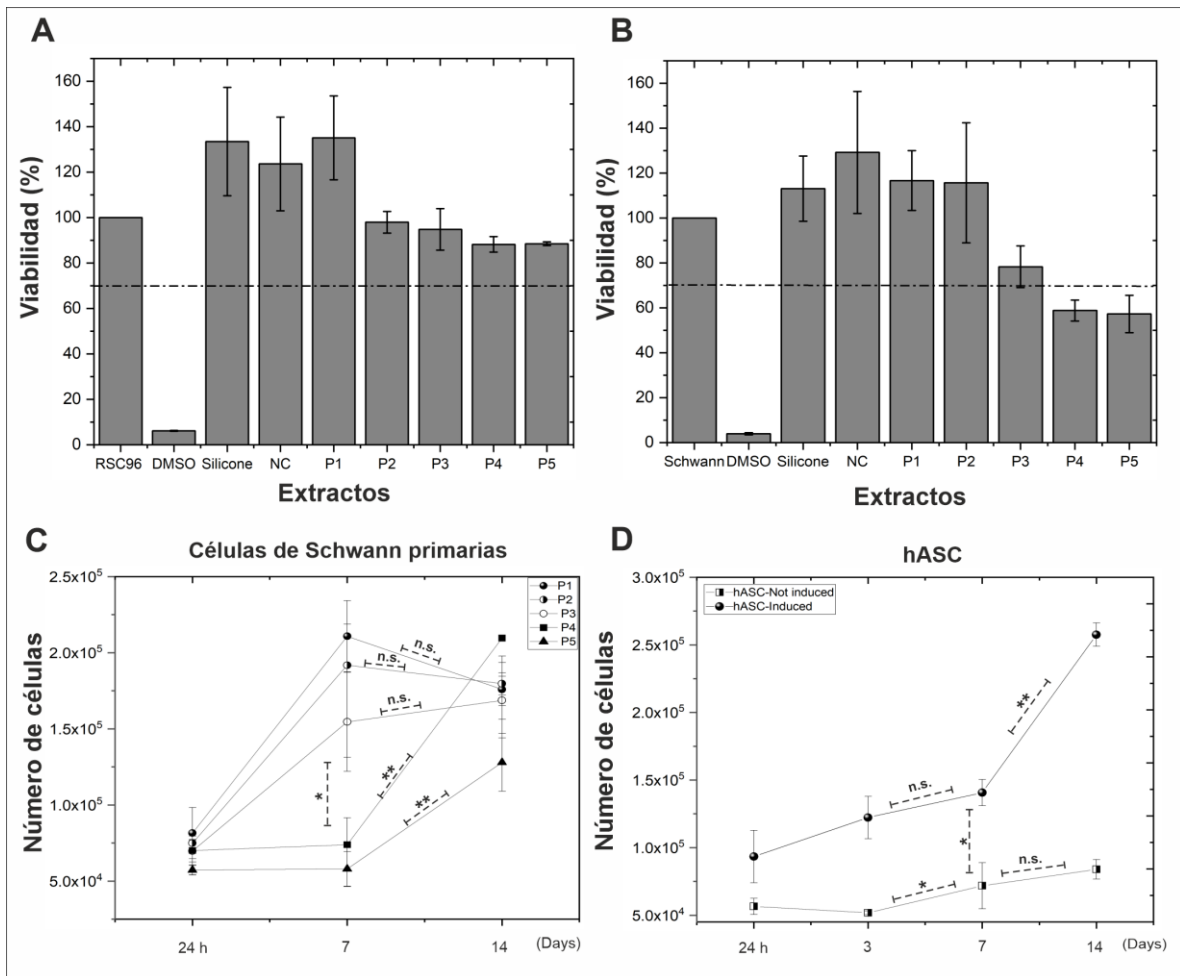


Figura 23. Evaluación de la citocompatibilidad de los soportes. **A.** Porcentaje de viabilidad celular de la línea celular RSC96. **B.** Porcentaje de viabilidad de las células de Schwann primarias. **C.** Proliferación de células de Schwann primarias en soportes P1-P5. **D.** Proliferación de las células hASC en los soportes P3. Diferencias significativas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Diferencias no significativas (n.s): $p > 0.05$.

6.2.4.4. Inmunohistoquímica de los soportes cultivados con células de Schwann primarias y hASC.

Células de Schwann primarias marcadas con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) se sembraron en las zonas U de los soportes P1, P2, P3, P4 y P5 para evaluar si se adherían a las fibras unidireccionales y su orientación. Adicionalmente, se tiñeron cultivos con anticuerpos anti S100b y p75^{NTR}. La observación con microscopía de fluorescencia de las células marcadas con CFDA mostró la presencia de

células adheridas a las fibras de colágeno tipo I orientadas en la misma dirección de las fibras del soporte. El análisis inmunohistoquímico demostró que las células sembradas expresan los marcadores S100b y p75^{NTR} (**Figura 24**).

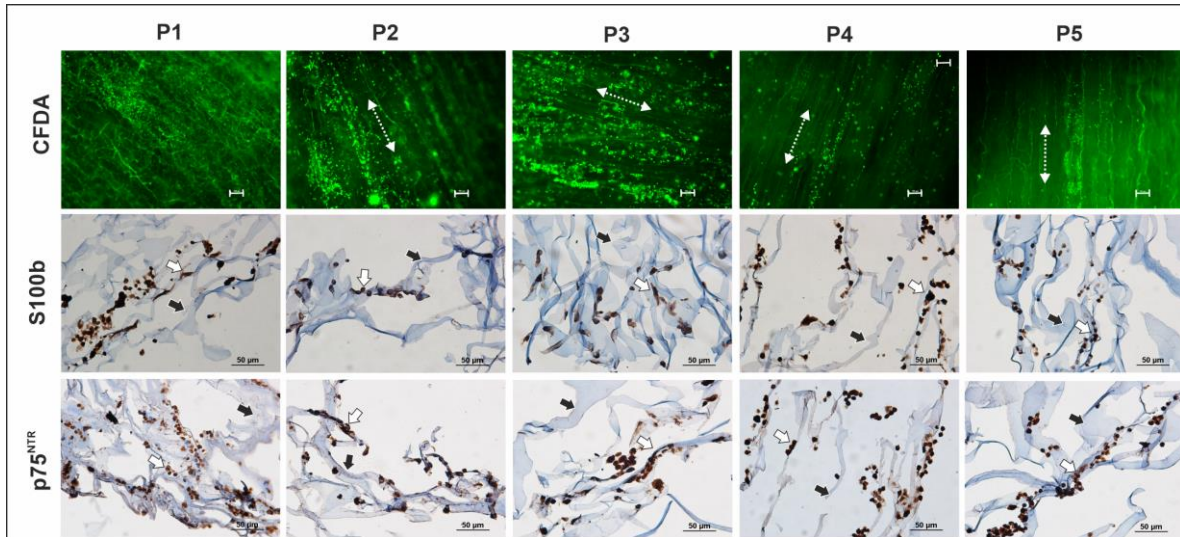


Figura 24. Microscopía de fluorescencia y evaluación inmunohistoquímica de los cultivos de células de Schwann en los soportes P1-P5. Se observan células marcadas con carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFDA), las flechas indican la orientación de las células adheridas a las fibras del soporte. La tinción con anticuerpos anti S100b y P75^{NTR} muestra que las células de Schwann conservan el fenotipo. Las flechas blancas señalan células de Schwann; las flechas negras, señala a las fibras de colágeno.

En la **Figura 25** se observan las hASC cultivadas con o sin medio de inducción de Schwann y teñidas con DAPI y anticuerpo anti-S100b. Las hASC cultivadas en DMEM fueron S100b negativas, mientras que las cultivadas en el medio de inducción de Schwann fueron S100b positivas, lo cual, indica su diferenciación a células similares a Schwann. La alineación de las células a lo largo de las fibras unidireccionales de colágeno del soporte P3 es evidente en los cultivos incubados con el medio de inducción.

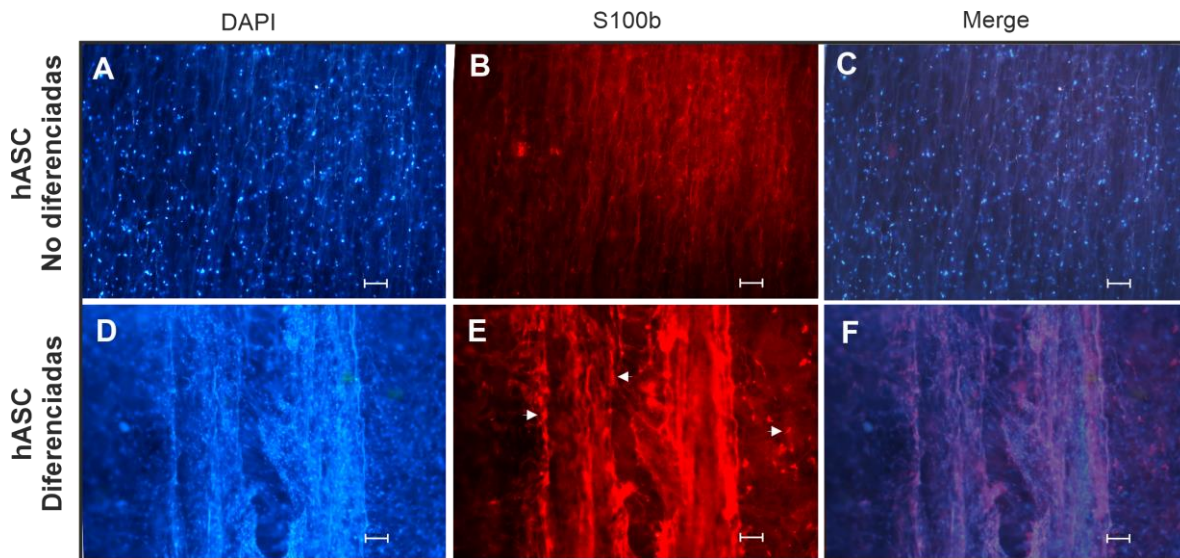


Figura 25. Células hASC cultivadas en los soportes P3. **A-C.** Imágenes de los soportes con hASC incubadas con DMEM y sin medio de inducción a células de Schwann. **D-E.** Imágenes de células cultivadas con medio de inducción a células de Schwann. **A, D.** Tinción de núcleos con DAPI. **B, E.** Inmunodetección de células marcadas con anticuerpo anti S100b. **C, F.** Combinación DAPI/S100b. Las flechas blancas en E señalan células adheridas a las fibras del soporte.

6.3. Resultados objetivo 3: *Evaluar la biocompatibilidad de los conductos desarrollados como injerto de nervio periférico en un modelo murino de lesión crítica de nervio ciático.*

6.3.1. Experimento animal

Después de desarrollar y caracterizar los soportes y evaluar la citocompatibilidad del conducto elaborado con el soporte P3, se procedió a evaluar su seguridad y eficacia en un modelo murino de lesión de nervio ciático, el cual, se creó durante el desarrollo de esta tesis. Este soporte se escogió para realizar el conducto porque, como se mencionó antes de describir los resultados de la evaluación de la actividad biológica, fue el que presentó las mejores características fisicoquímicas, mecánicas y biológicas *in vitro*. A continuación, se describen los resultados del experimento animal.

6.3.1.1. Resultados postquirúrgicos

Durante el seguimiento clínico de los animales intervenidos, no se evidenciaron dehiscencias de las heridas ni signos de infección postquirúrgica. Las neurorrafias se realizaron sin inconvenientes técnicos y los conductos permitieron su enrollamiento, manejo, posicionamiento y sutura en el sitio de la lesión.

6.3.1.2. Recuperación de la función motora (índice funcional ciático -SFI)

Para evaluar cuantitativamente la recuperación del movimiento locomotor, se calculó el índice funcional ciático (SFI). Todos los animales intervenidos tenían flexión y contractura de los dedos del pie del miembro intervenido, esta contractura fue más notoria en las ratas lesionadas y no injertadas. La **Figura 26** muestra una imagen representativa de las huellas plantares de los animales registradas a las 4, 8 y 12 semanas después de realizada la cirugía. Se puede observar la similitud entre la huella plantar del animal autoinjertado y el que fue injertado con el conducto elaborado con el soporte P3. Aunque los animales injertados con el conducto P3 no extendieron completamente el dedo del pie, mostraron menos contractura y un aumento en la extensión de los dedos similar a lo observado en el grupo de autoinjerto a las 8 y 12 semanas después de la cirugía.

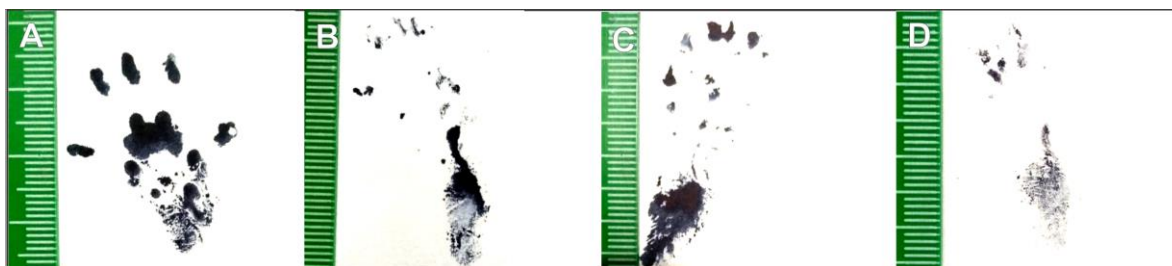


Figura 26. Huellas plantares. **A.** Extremidad contralateral sin intervenir (usada como control). **B.** Autoinjerto. **C.** Injerto de conducto P3. **D.** Cicatrización por segunda intención.

El SFI no se determinó en las dos primeras semanas porque los animales no podían extender los dedos de los pies. Los valores de SFI a las 4 y 8 semanas fueron significativamente menores ($p < 0.05$) para los animales lesionados no injertados que para los animales

autoinjertados e injertados con P3, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre estos dos últimos grupos ($p = 0.618$). En la semana 12, se observó una recuperación parcial de la función locomotora en los dos grupos injertados, que no fue significativamente diferente ($p = 0.999$). La mayoría de los animales lesionados no injertados realizaron autotomía en dos o más dedos en la semana 12; por eso, el SFI de este grupo no se determinó después de la semana 8 (**Figura 27**).

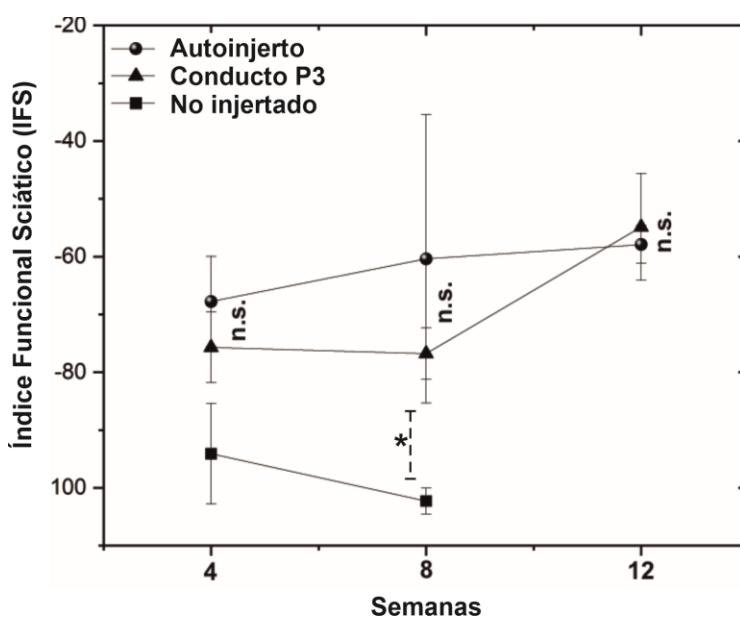


Figura 27. Índice funcional ciático. Valores correspondientes a los tres grupos evaluados. Diferencias significativas: $*p < 0.05$; Diferencias no significativas: n.s. $p > 0.05$.

6.3.1.3. Características clínicas de las lesiones nerviosas reparadas

Doce semanas después de la cirugía los animales se sacrificaron para evaluar la reparación del nervio ciático. En el autoinjerto la sutura fue reabsorbida, se observó la continuidad del nervio reparado, la apariencia fue similar a los cabos distal y proximal del nervio (**Figura 28 A-B**). En los animales injertados con el conducto P3 tampoco se observó evidencia de sutura, el recambio del conducto y su reemplazo con tejido nervioso de diámetro y apariencia similar al muñón distal. Las características clínicas del nervio formado fueron similares a las del nervio autólogo injertado (**Figura 28 C-D**). Como era de esperar, en las ratas no injertadas

se observaron brotes neurales desorganizados que no alcanzaron el muñón distal (**Figura 28 E-F**).

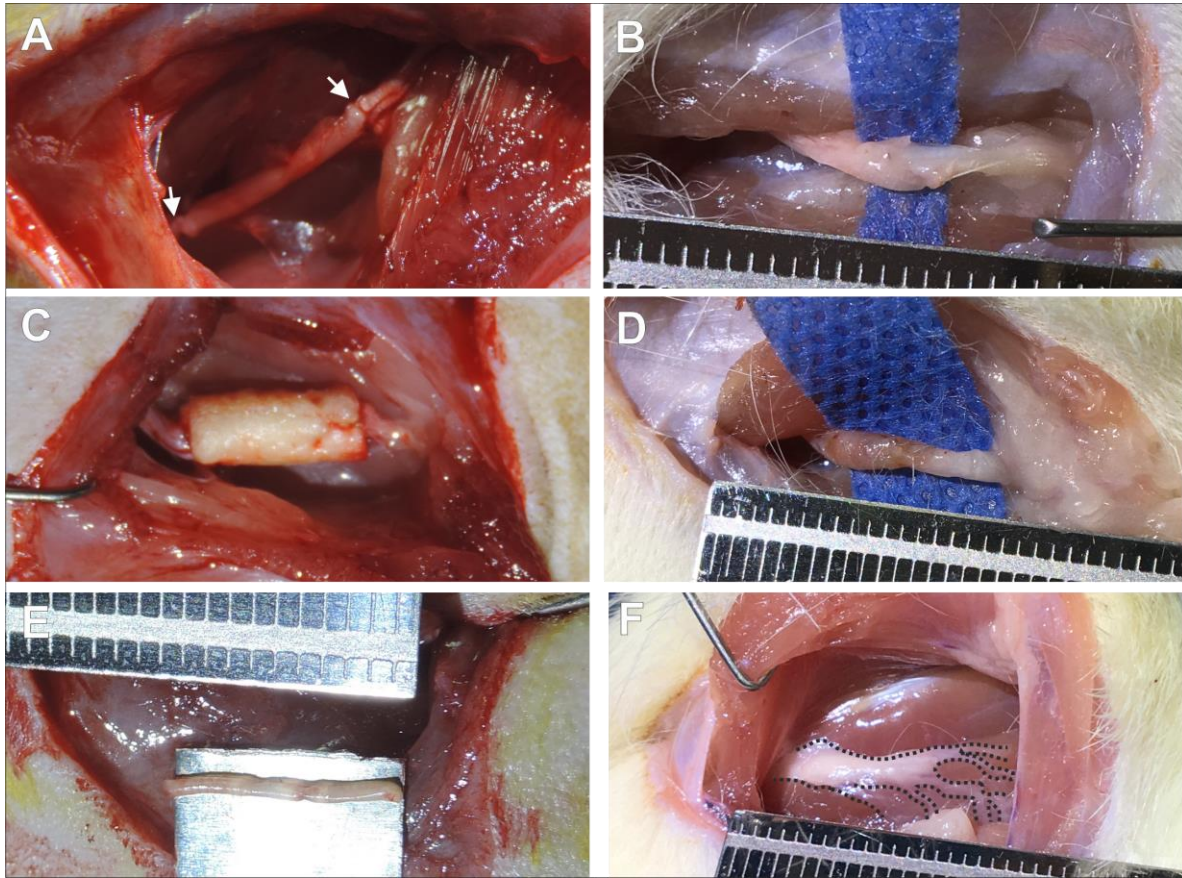


Figura 28. Observación del nervio ciático intervenido y reparado. **A.** Autoinjerto; las flechas indican los puntos de la sutura epineural. **B.** Reparación lesión intervenida con el autoinjerto. **C.** Lesión injertada con el conducto P3. **D.** Reparación lesión injertada con el conducto P3. **E.** Nervio ciático resecionado del animal no tratado. **F.** Reparación lesión no injertada; las líneas punteadas delimitan los brotes axonales desorganizados no regenerados. Las imágenes de las zonas reparadas fueron tomadas doce semanas después de la cirugía.

6.3.1.4. Análisis histomorfométrico de los nervios

Para el análisis histológico se usaron cortes de la zona distal de los nervios reparados de todos los animales (grupos I, II y III). Como control se incluyó el nervio sano de una extremidad contralateral no intervenida. En los cortes del nervio sano se encontraron axones mielinizados uniformes, con morfología redonda y envoltura mielínica intensamente teñida de azul, así como, pocas agrupaciones o “clusters” de axones en proceso de mielinización (**Figura 29 A**). En el nervio autoinjertado se observaron axones mielinizados con un diámetro aparentemente menor que el diámetro de los axones sanos de la **Figura 29 A**. Se evidenció más tejido conectivo de sostén y vainas de mielina delgadas, que no parecen corresponder al diámetro del axón, en algunos axones en proceso de mielinización; también, se observaron agrupaciones de axones en proceso de regeneración (**Figura 29 B**). Hallazgos similares se encontraron en el análisis del nervio injertado con el conducto P3, en el que se detectaron axones mielinizados de diámetro mediano y pequeño, agrupados en pequeños haces y distribuidos a lo largo del corte transversal del nervio. Sin embargo, en este caso la asimetría de los axones fue mayor que la simetría encontrada en el nervio autoinjertado (**Figura 29 C**). En el nervio seccionado reparado por segunda intención se observaron pocos axones, abundante tejido conectivo y ausencia de haces (**Figura 29 D**).

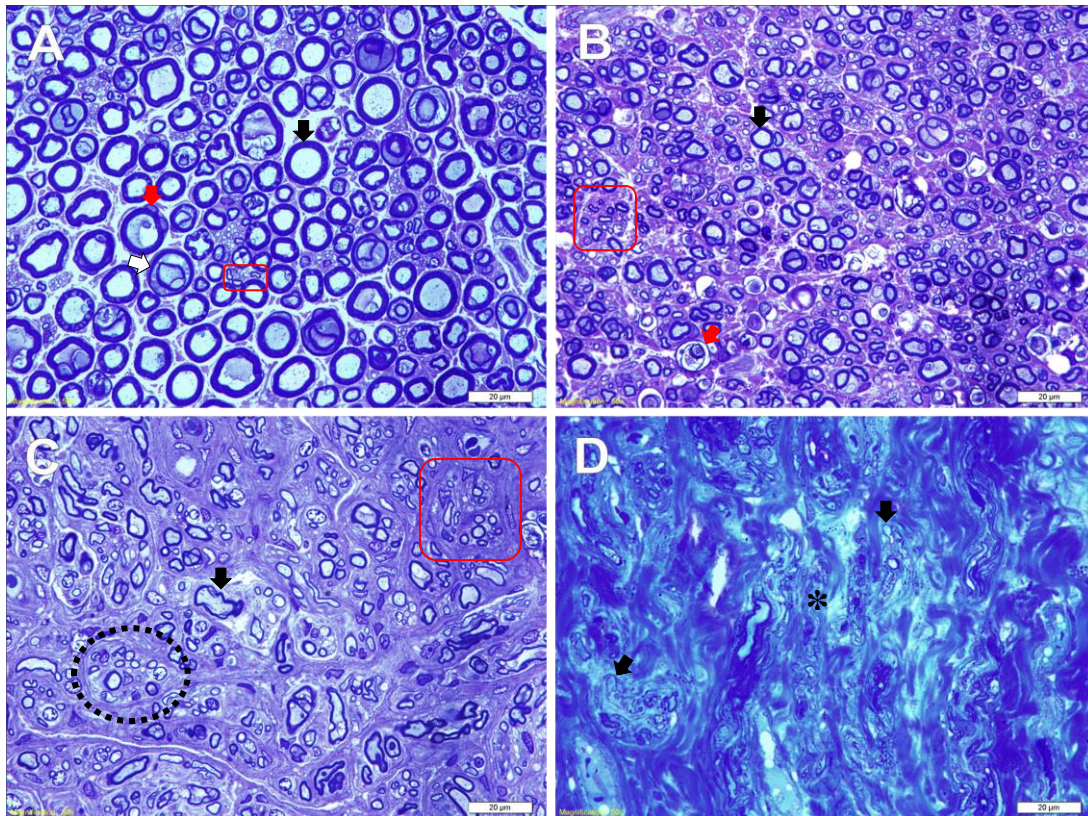


Figura 29. Evaluación histológica de secciones transversales de los nervios reparados teñidas con azul de toluidina. **A.** Nervio ciático. Flecha negra: axón simétrico; flecha roja: núcleo de una célula de Schwann; flecha blanca: invasiones mielínicas hacia la región axonal; rectángulo rojo: axones en proceso de regeneración. **B.** Nervio ciático autoinjertado. Flecha negra: axón mielinizado con diámetro menor al de los axones del nervio sano; flecha roja: vainas de mielina delgadas en proceso de mielinización; *: tejido conectivo; rectángulo rojo: axones en proceso de regeneración. **C.** Nervio ciático injertado con el conducto P3. Flecha negra: axón asimétrico, *: tejido conectivo; rectángulo rojo: axones en proceso de mielinización; círculo punteado: axones dispuestos en fascículos. **D.** Nervio ciático reparado por segunda intención. Flecha negra: axones amielínicos; *: tejido conectivo.

Se hicieron cortes longitudinales de fascículos de fibras nerviosas de los nervios sanos e intervenidos, las cuales, se visualizaron con microscopía de autofluorescencia. Las imágenes mostraron fibras nerviosas orientadas unidireccionalmente en el nervio sano (**Figura 30 A**) y en el nervio autoinjertado (**Figura 30 B**). En el nervio injertado con el conducto P3, las fibras también se orientaron unidireccionalmente, sin embargo, la densidad de las fibras fue menor que en los casos anteriores (**Figura 30 C**). En el nervio lesionado no injertado, se

observaron fibras desorganizadas y brotes axonales orientados en diferentes direcciones (**Figura 30 D**).

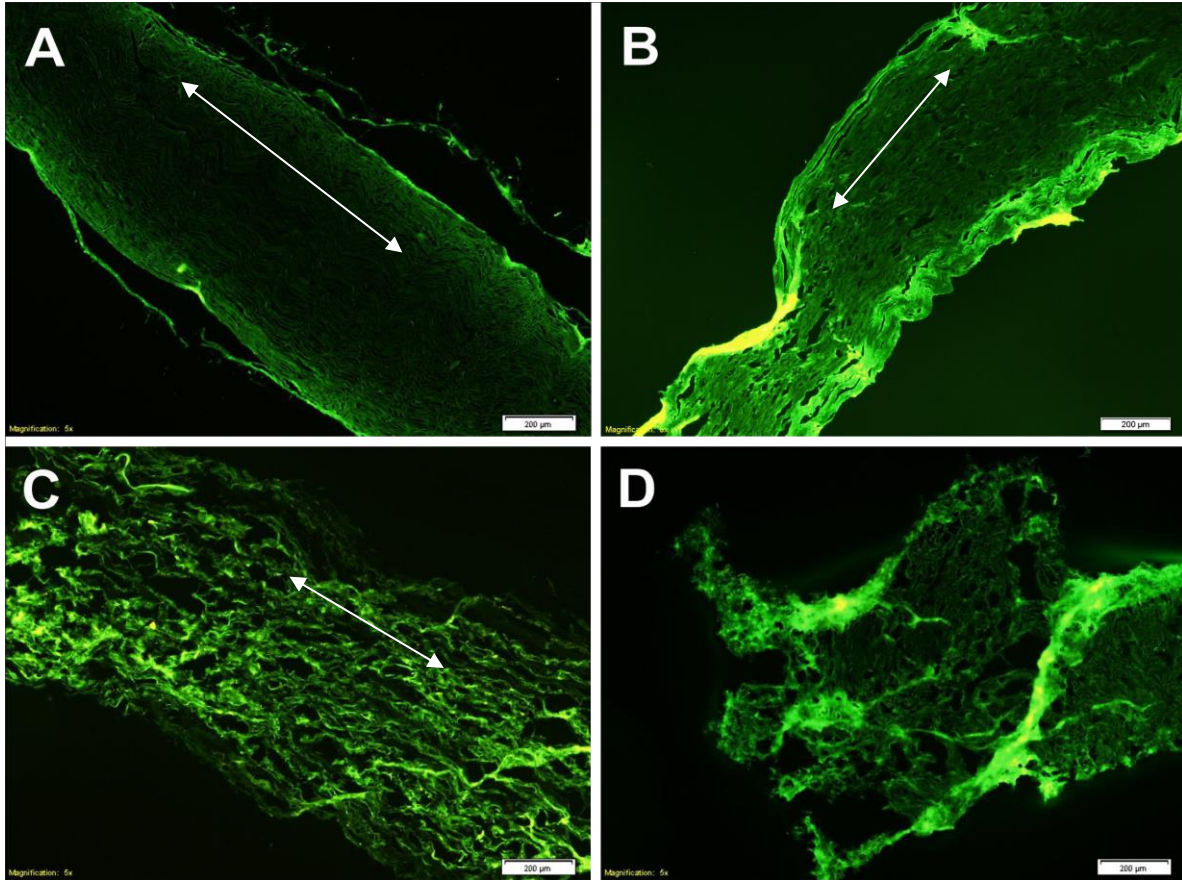


Figura 30. Imágenes de autofluorescencia representativas de los cortes longitudinales de los nervios tratados. **A.** Nervio periférico sano. Flechas blancas: fibras longitudinales de tejido endoneural. **B.** Nervio periférico autoinjertado. Flecha blanca: fibras densas de tejido endoneural orientadas longitudinalmente parecidas a las del nervio sano. **C.** Nervio injertado con el conducto P3. Flecha blanca: fibras de tejido endoneural orientadas longitudinalmente con densidad disminuida; *: espacios entre las fibras. **D.** Cabo nervioso presente en los brotes axonales de los animales no injertados: se observa pérdida de la estructura del tejido endoneural.

La valoración cuantitativa realizada con el análisis histomorfométrico mostró que la densidad axonal fue similar en los animales sanos e injertados ($p > 0.05$). No hubo diferencias significativas entre el autoinjerto y los animales injertados con el conducto P3 ($p = 0.999$). En el grupo no injertado, este parámetro fue significativamente menor que en los animales autoinjertados ($p = 0.018$) y en los injertados con el conducto P3 ($p = 0.020$) (**Figura 31 A**).

El diámetro de los axones en los dos grupos injertados fue similar ($p = 0.283$), sin embargo, los diámetros del autoinjerto y de los nervios injertados con P3 fueron significativamente más bajos que los del control sano ($p = 0.004$ y $p = 1.2 \times 10^{-4}$, respectivamente). Este parámetro fue significativamente menor en los animales no injertados que en los animales con autoinjerto ($p = 0.006$) o injertados con el conducto P3 ($p = 0.001$) (**Figura 31 B**). El grosor de la mielina fue similar en animales sanos, en los autoinjertados y en los injertados con el conducto P3 ($p = 0.709$ y $p = 0.059$, respectivamente) y no hubo diferencias entre los grupos injertados ($p = 0.432$). Sin embargo, este grosor fue significativamente menor en los animales no injertados que en los sanos ($p = 5.2 \times 10^{-4}$), autoinjertados ($p = 0.007$) e injertados con el conducto P3 ($p = 0.001$) (**Figura 31 C**).

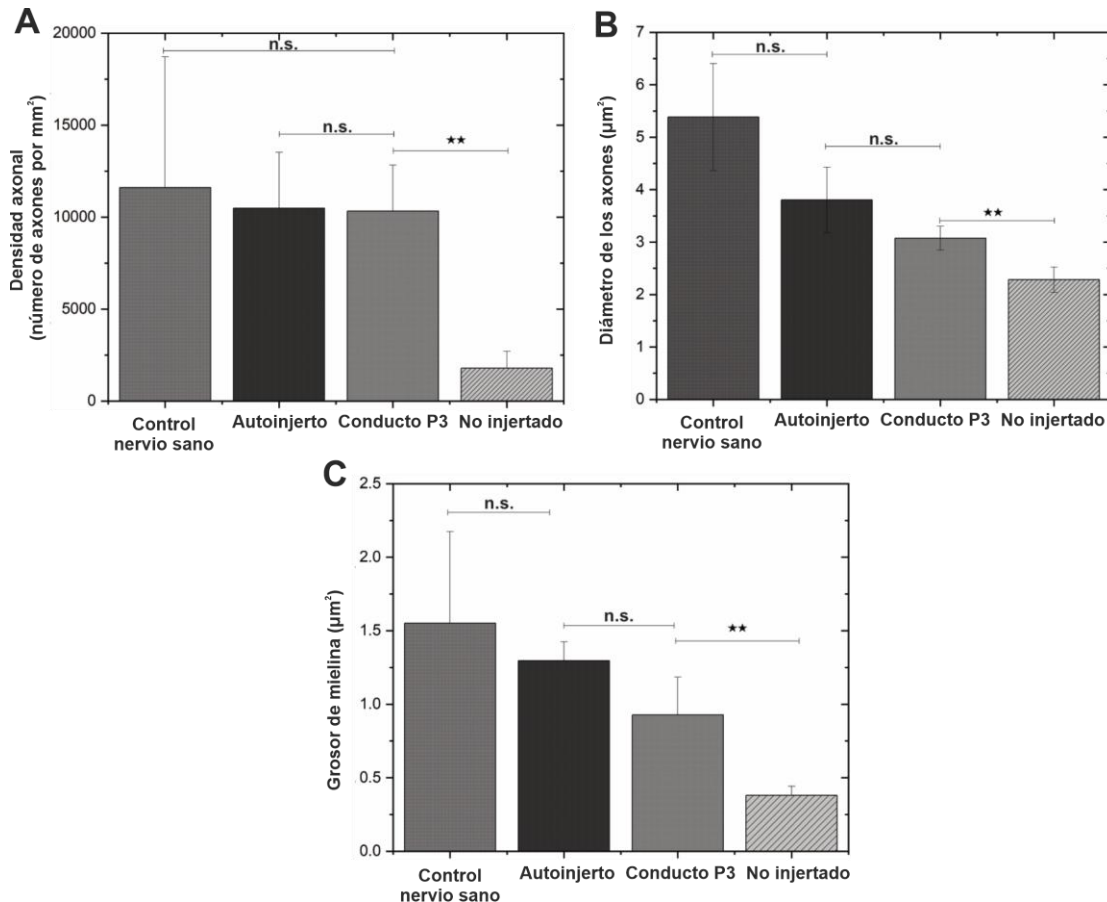


Figura 31. Análisis histomorfométrico. **A.** Densidad de axones por mm². **B.** Diámetro de los axones. **C.** Grosor de mielina. Diferencias significativas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Diferencias no significativas: n.s.: $p > 0.05$.

6.3.1.5. Análisis cualitativo del músculo gastrocnemio

Las secciones transversales del músculo gastrocnemio de los miembros intervenidos fueron teñidos con tricrómico de Masson y analizadas histológicamente (**Figura 32**). En el músculo sano del miembro contralateral no intervenido empleado como control, se observaron formas poligonales características del tejido muscular (**Figura 32 A**). Estas formas poligonales también se vieron en el músculo de los animales autoinjertados e injertados con el conducto P3, sin embargo, en estos grupos se evidenció presencia de colágeno (coloración azul) y tejido adiposo (espacio en blanco tabicado) (**Figuras 32 B, C**). En el grupo no injertado se encontraron fibras musculares atróficas de aspecto irregular, tejido conectivo fibroso que reemplaza el tejido muscular y vasos sanguíneos (**Figura 32 D**).

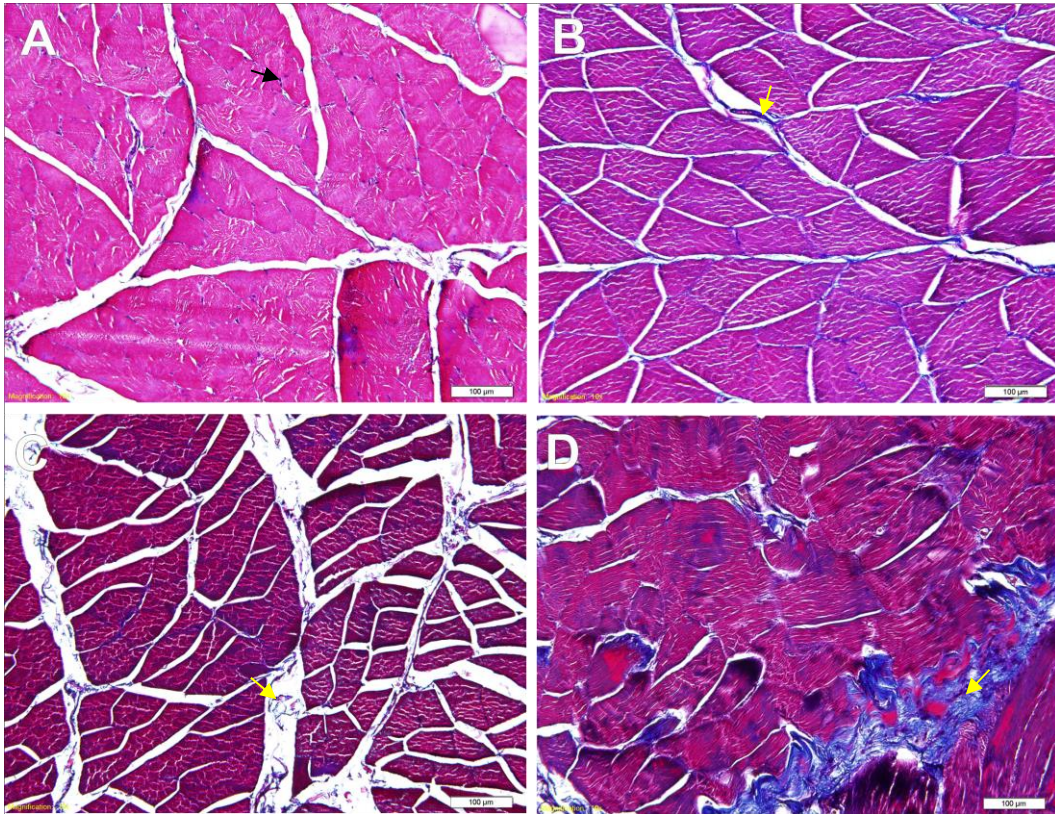


Figura 32. Evaluación histológica de cortes transversales del músculo gastrocnemio. **A.** Tejido muscular sano con células esqueléticas estriadas con morfología hexagonal y numerosos núcleos en color azul (flechas negras). **B.** Tejido muscular de animales autoinjertados. **C.** Tejido muscular de animales injertados con el conducto P3. **D.** Tejido muscular de animales no injertados. Flechas amarillas: tejido conectivo fibroso.

Como resultado de la denervación de los músculos diana, la lesión del nervio ciático puede provocar atrofia muscular (98). Para evaluar la atrofia muscular, se estableció la relación entre la masa muscular del músculo gastrocnemius del miembro intervenido y la masa muscular del músculo gastrocnemius del miembro sano contralateral. Después de pesar los músculos fijados de los lados lesionados (Wi) y sanos (Wh), se determinó la relación W_i / W_h . Los animales implantados con el autoinjerto tuvieron mayor masa muscular que los animales injertados con P3, sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p = 0.083$). En los animales no injertados, esta relación fue significativamente menor que en los animales que recibieron el autoinjerto ($p = 0.003$) y en los animales injertados con P3 ($p = 0.031$) (Figura 33).

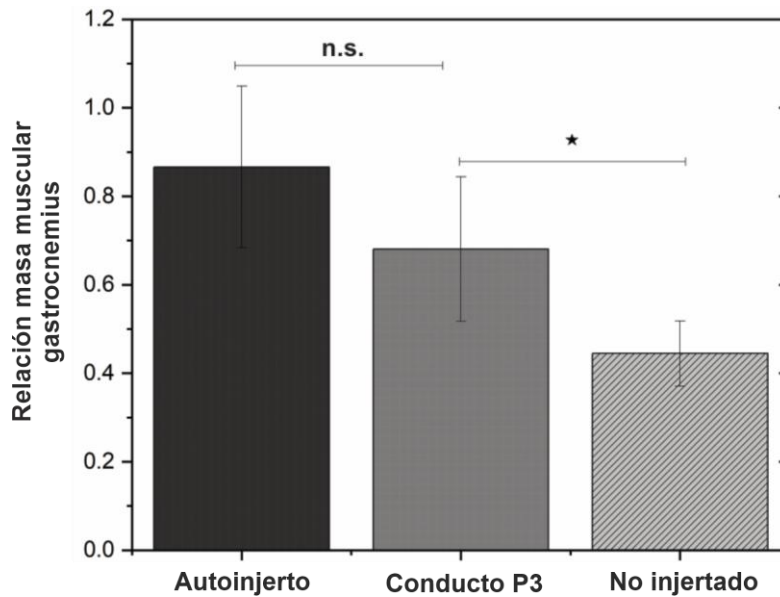


Figura 33. Evaluación de atrofia muscular de músculo gastrocnemio. Relación de la masa muscular de tejido del miembro intervenido sobre el miembro sano contralateral después de 12 semanas de tratamiento. Diferencias significativas: * $p < 0.05$; n.s.: $p > 0.05$.

7. Discusión

La regeneración de las lesiones nerviosas periféricas continúa siendo un desafío para la investigación médica. El autoinjerto de nervio ha sido el tratamiento estándar para las lesiones grandes, sin embargo, este enfoque está limitado por la disponibilidad de nervios autólogos y porque puede presentarse fallo terapéutico que resulta en la pérdida de sensibilidad y función motora (5). Para el tratamiento de nervios periféricos lesionados que, como consecuencia del tamaño de la lesión, no pueden regenerarse espontáneamente se han desarrollado conductos nerviosos elaborados con diferentes materiales que sirven como neuroprotectores y guías del crecimiento del cono axonal. Aunque la mayoría de estos conductos funcionan en defectos nerviosos menores de 3.0 cm, su uso en lesiones más largas es controvertido (8,19). Hoy en día se sabe, que los soportes con microestructura orientada impactan la morfología y el comportamiento de las células que crecen dentro de ellos (21,23). Trabajos publicados han demostrado que conductos de colágeno-elastina cilíndricos con canales longitudinales en el interior promueven el crecimiento axonal dirigido (25,26). Para elaborarlos, se utilizó un procedimiento de congelación unidireccional patentado (99) que promueve el congelamiento de la dispersión de colágeno-elastina en forma vertical desde la parte inferior hacia la superior del dispositivo de congelamiento. Las esponjas con canales longitudinales resultantes se perforan para extraer cilindros con canales orientados longitudinalmente con diámetros y longitudes fijos. A pesar de que estos conductos ofrecen canales unidireccionales que guían el crecimiento axonal en forma parecida a como lo hace el autoinjerto nervioso, su diámetro no se puede ajustar al de los muñones intervenidos. Cuando esto ocurre, el injerto puede no funcionar causando el fracaso de la intervención terapéutica.

En el mercado se encuentra una lámina de colágeno I (NeuraWrap®) que envuelve los nervios periféricos lesionados, ajustándose al diámetro de los muñones del nervio afectado. Sin embargo, por ser una envoltura este producto carece de microestructura interna direccionada que guíe el crecimiento axonal. Por eso, al actuar como una interface no

constrictiva que separa al nervio lesionado del ambiente tisular que lo rodea no está indicado para direccionar la regeneración de los axones nerviosos (100).

Como alternativa a los productos existentes y con el fin de superar sus limitaciones, esta tesis propuso evaluar la hipótesis de que un soporte bifásico con una zona de poros unidireccionales continua a una con poros multidireccionales, se puede enrollar para formar un conducto con microestructura unidireccional interna cubierto por una envoltura con microestructura multidireccional externa; el cual, se pueda ajustar durante el acto quirúrgico al diámetro de los muñones del nervio en que se injerte. Inicialmente, se estableció un procedimiento para congelar, con métodos diferentes y de manera secuencial, dos dispersiones de colágeno tipo I de concentraciones diferentes (5 mg/g y 8 mg/g). Aplicando una metodología establecida y patentada por nuestro grupo de investigación (74,75), la dispersión de menor concentración se expuso a un gradiente de temperatura con el fin de congelarla longitudinalmente - de un extremo al extremo opuesto del dispositivo de congelamiento - para formar cristales de hielo unidireccionados que sirvieran como porógenos. El dispositivo de congelamiento empleado en el proceso, diseñado durante la ejecución de esta tesis, permitió que después de hacer el congelamiento unidireccional de la dispersión de colágeno de menor concentración se pudiera servir la dispersión de mayor concentración y congelar - siguiendo un procedimiento empleado por el grupo - para obtener soportes con cristales de hielo orientados en diferentes direcciones. Al liofilizar las dispersiones congeladas diferencialmente, se obtuvieron soportes bifásicos laminares (10 cm²) de colágeno tipo I constituidos por una zona con poros unidireccionales (U) adyacente a una zona con poros multidireccionales (M). Con este diseño, el soporte bifásico se puede plegar desde la zona unidireccional a la multidireccional las veces que se requiera para que el conducto coincida con el diámetro de los muñones que se quieren conectar. Debido a que hasta el momento ningún producto comercial tiene una estructura tridimensional adaptable al diámetro del nervio seccionado el procedimiento establecido, el soporte bifásico y el conducto se incluyeron en una solicitud de patente presentada por la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá a la Superintendencia de Industria y Comercio y vía Patent Cooperation Treaty (PCT).

La evaluación de la microestructura de la zona U de los soportes demostró la formación de poros que forman canales continuos con baja interconectividad, indispensables para que al formar el conducto se guíe el crecimiento axonal *in vivo*. Los resultados de la evaluación preclínica hecha en el modelo animal de lesión de nervio ciático confirmaron que el conducto elaborado con el soporte P3 previene brotes nerviosos desorganizados y guía el crecimiento axonal unidireccionalmente. También, que en el nervio ciático injertado se formaron estructuras similares a la del tejido endoneural, lo cual, previene la interferencia en la conducción de los impulsos nerviosos de axones vecinos (34).

El diámetro de los poros que forman los microcanales de la zona U, es importante porque permite la migración axonal y de las células de Schwann, el crecimiento de los vasos sanguíneos y la difusión de factores neurotróficos dentro del conducto nervioso. Un diámetro demasiado pequeño evita el crecimiento de los vasos sanguíneos y el intercambio efectivo de nutrientes y fluidos en los conductos (101). Aunque no son muchos los trabajos que evalúen el efecto del diámetro de los microcanales de los soportes unidireccionados en el crecimiento axonal se ha descrito que los axones, los vasos sanguíneos y las células gliales son regeneradas en microcanales lineales con diámetros en el rango de 100 μm a 300 μm (102). En esta tesis, la dispersión del tamaño de los poros de la zona U del soporte P3 estuvo entre 67.01 μm y 303.2 μm , con un promedio de 184 μm , el cual se encuentra en el rango de los diámetros de los fascículos individuales (200 μm y 1000 μm) de los nervios femorales y de los nervios que conforman las extremidades superiores humanas (103,104). Lo interesante, es que el trabajo pudo confirmar con los resultados del modelo animal que el tamaño de los poros fue compatible con el crecimiento axonal organizado y unidireccional en el nervio ciático seccionado.

El tamaño medio de los poros de las zonas M ($286.6 \pm 129 \mu\text{m}$) de todos los soportes fue mayor que el tamaño medio de la zona U ($211.3 \pm 100 \mu\text{m}$). El resultado descrito, no soporta la hipótesis de que la envoltura del conducto nervioso elaborado con mayor concentración de colágeno previene la migración de fibroblastos hacia el interior del conducto porque los

tamaños de poro de las zonas M son compatibles con la migración y el crecimiento de los fibroblastos (69,105). No obstante, la reparación conseguida con el conducto elaborado con el soporte P3, similar a la observada al emplear el autoinjerto, sugiere que la disposición en la capa externa de la zona con poros multidireccionales y en la parte interna de los microcanales formados por los poros unidireccionales de la zona U controla la presencia de fibroblastos en la zona del nervio injertada favoreciendo el crecimiento axonal y el de las células de Schwann.

En estrecha relación con el párrafo anterior, los resultados de la degradación enzimática mostraron que en el día 30 el 65% de la zona M y el 50% de la zona U del soporte P3 se habían degradado. El hecho de que la zona M se degradara más rápido que la zona U, que constituye la microestructura unidireccional del interior del conducto, sugiere un efecto de barrera de la envoltura multidireccional del conducto en las fases temprana e intermedia de la reparación, suficiente para crear el microambiente inicial que propicia la migración guiada de los axones del muñón proximal. Los datos clínicos, histológicos e histomorfométricos sugieren que una vez iniciada la reconexión, la degradación gradual de la envoltura formada por la zona M evita la compresión de los axones (106).

Un conducto que guíe la regeneración de nervio periférico debe encontrar un equilibrio entre la estabilidad mecánica - proporcionada por el entrecruzamiento - y la biodegradación (69,107). El soporte P3 entrecruzado con glutaraldehído al 0.06% fue el único soporte citocompatible que no se degradó completamente en el día 30 del ensayo enzimático; como se mencionó anteriormente, este fue uno de los resultados que se tuvo en cuenta en la escogencia del conducto P3 para el estudio preclínico en el modelo animal. Al degradarse más lentamente que los otros soportes no citotóxicos (N, P1 y P2), permite que el conducto guíe la migración axonal mientras ocurre la reconexión. Esta decisión probó ser acertada ya que los resultados del ensayo animal indirectamente demostraron que el conducto P3 se degrada permitiendo que el proceso de regeneración del nervio ciático lesionado se lleve a cabo.

Cuando se injertan los conductos se exponen a fluidos biológicos, por eso, es importante estudiar la hidrofiliidad de los soportes y su capacidad de interactuar con fluidos. Estos parámetros predicen la capacidad que tiene el conducto para permitir la difusión/flujo de nutrientes desde el líquido intersticial al tejido nervioso (20). Este trabajo no encontró diferencias significativas en la porosidad y tamaño de poro de las zonas U y M de los soportes. Sin embargo, demostró que la direccionalidad del poro afecta la capacidad de sorción de líquidos de los soportes, lo cual, se puede explicar por sus diferencias en composición y microestructura. Por composición, porque al aumentar la concentración de colágeno las fibras poliméricas hidrófilas aumentan y con ello la capacidad de retener líquidos (27). Por eso, en todos los casos los valores de capacidad de sorción de líquidos fueron más altos en las zonas M (8 mg /g) que en las U (5 mg/g). Por microestructura, porque al aumentar la tortuosidad también aumenta la capacidad de retener líquidos del soporte (108,109). De ahí, que las zonas M al ser más tortuosas que las zonas U presentaran mayor capacidad de sorción. Finalmente, los valores de ángulo de contacto, por encima de 50° y por debajo de 90°, indicaron que todos los soportes son hidrofílicos. En conjunto, la capacidad de sorción de líquidos y la hidrofiliidad de los soportes producidos sugieren su habilidad de retener agua y su capacidad de interactuar con las células *in vivo* (110).

Es conveniente estudiar las propiedades de tracción de los conductos nerviosos porque los nervios periféricos *in vivo* están expuestos constantemente a una carga que da lugar a una tensión de tracción (111). Además, porque los conductos nerviosos deben ser flexibles para evitar la compresión de los axones en crecimiento (14). El módulo de Young del conducto elaborado con el soporte P3 (0.437 MPa) fue cercano al del nervio ciático descelularizado de ratas (0.576 ± 0.16 MPa) (112). Los resultados del experimento animal confirmaron la importancia de este valor predictivo de la flexibilidad y la resistencia exhibida por el conducto *in vivo*, ya que al injertar el conducto P3 en el nervio ciático transectado se promovió la reconexión axonal del nervio en forma similar a como lo hizo el autoinjerto de nervio ciático.

La carga eléctrica superficial de los conductos afecta su biocompatibilidad cuando se injertan en un nervio lesionado porque impacta la adhesión de neuronas, células de Schwann y otros tipos de células (83,113). Los fibroblastos se adhieren menos a soportes con carga superficial negativa que a soportes con carga superficial positiva (114). En este trabajo el potencial Z fue negativo en las zonas M y positivo en las zonas U de los soportes P3-P5. Aunque no se evaluó la adhesión celular a cada una de estas zonas, los datos de potencial Z sugieren que la envoltura exterior del conducto formada por las zonas M del soporte, no favorece la adhesión de los fibroblastos a su superficie. También, que el interior unidireccional formado por las zonas U promueve la adhesión y proliferación de las células de Schwann *in vivo*. Estudiar el efecto del potencial Z en la adhesión de fibroblastos y células de Schwann, puede ayudar a comprender mejor cómo el conducto P3 favorece la reconexión axonal en forma similar a como lo hace el autoinjerto.

Los ensayos *in vitro* de citotoxicidad y crecimiento de las células en los soportes son buenos predictores de la citocompatibilidad que *in vivo* tiene un conducto para regeneración nerviosa. Además, hacen parte de la evaluación de seguridad y eficacia requerida para determinar el potencial del conducto para interactuar con las células que pretende guiar durante la reconexión axonal. Esta tesis analizó estos parámetros en todos los soportes desarrollados como parte de la caracterización de su actividad biológica y los resultados de estos ensayos, junto con los de los ensayos mecánicos y fisicoquímicos, se tuvieron en cuenta en la selección del soporte P3 para elaborar el conducto P3 empleado en el ensayo animal. La citocompatibilidad del conducto P3 fue confirmada por los resultados funcionales, histológicos e histomorfométricos de la evaluación preclínica, demostrándose el valor predictivo de los ensayos *in vitro*.

Un conducto que conecta un nervio transectado debe interactuar con las células madre presentes en la zona lesionada, las cuales, tienen el potencial de convertirse en células similares a Schwann y expresar factores neurotróficos NGF, BDNF, GDNF y NT4 (98,115). Por lo anterior, este trabajo también usó cultivos primarios de hASC sembradas en la zona U del soporte P3 para evaluar su diferenciación a células similares a células de Schwann en

presencia o ausencia de medio de inducción de células de Schwann. Efectivamente, las hASC se adhirieron y alinearon en la misma dirección de las fibras unidireccionales del soporte; además, proliferaron y se diferenciaron en células S100b positivas con morfología de huso típica de células de Schwann.

Como se mencionó anteriormente, se creó un modelo murino de lesión de nervio ciático con el que demostró que el conducto formado con el soporte bifásico P3 se ajustaba al diámetro de los muñones y guiaba a través de su microestructura interna unidireccionada el crecimiento axonal. Los datos del análisis histológico mostraron la presencia de axones mielinizados en la porción distal de los nervios injertados en todos los animales tratados con el conducto y con autoinjertos. Aunque el diámetro de los axones en estos dos grupos parecía menor que el del nervio sano utilizado como control, el análisis histomorfométrico no mostró diferencias significativas entre ellos. A pesar de que no hubo diferencias significativas en el número de axones y el grosor de la vaina de mielina, los axones formados en animales injertados con P3 fueron menos simétricos que los formados en animales autoinjertados, lo que indica que las fibras formadas en el conducto P3 eran menos maduras. En general, el ensayo animal demostró que este conducto es biocompatible, se integra y remodela cuando se injerta en la lesión del nervio ciático promoviendo la regeneración del nervio en toda su longitud, como fue demostrado por los cortes longitudinales de los nervios intervenidos que evidencia la presencia de tejido endoneural.

Finalmente, el músculo gastrocnemio se atrofia cuando se lesiona el nervio ciático. Esto da como resultado una disminución del peso muscular y cambios estructurales, incluida la formación de tejido conjuntivo fibrótico y grasa, que conducen al deterioro progresivo de la función muscular (98). Nosotros no encontramos diferencias en el peso del músculo gastrocnemio entre los animales injertados con el autoinjerto y los injertados con el conducto P3. Sin embargo, hubo diferencias significativas entre estos dos grupos y los animales no injertados. Los datos presentados en este trabajo confirman que injertar el conducto P3 en las lesiones del nervio ciático evaluadas conduce a resultados similares a los obtenidos con el autoinjerto.

8. Conclusiones

En este trabajo se entrecruzaron dos dispersiones de colágeno tipo I con diferentes concentraciones de glutaraldehído y se congelaron empleando metodologías diferentes, una de las cuales, no había sido reportada. Con la utilización secuencial de los dos procedimientos de congelamiento se obtuvo una dispersión congelada bifásicamente. La liofilización de esta dispersión produjo soportes laminares con zonas porosas continuas unidireccionales/multidireccionales, que al enrollarse desde la zona unidireccional a la multidireccional forman un conducto con microestructura interna unidireccional que guía el crecimiento axonal. Se debe hacer énfasis en que el diámetro del conducto se puede ajustar al diámetro de los muñones de un nervio periférico seccionado, controlando el número de plegamientos de la zona U del soporte. La evaluación *in vitro* de las propiedades fisicoquímicas, microestructurales y mecánicas de los soportes, así como, el estudio de bioactividad (biodegradabilidad, glutaraldehído residual, citocompatibilidad) sirvieron para escoger al soporte P3 para hacer los ensayos de proliferación y diferenciación de los cultivos de hASC primarias y para realizar el estudio preclínico en el modelo de lesión de nervio ciático que se desarrolló durante la tesis. Los resultados de la evaluación *in vivo* de los conductos P3 fueron similares a los obtenidos con el autoinjerto, que hasta el momento es el tratamiento estándar. Lo cual, evidencia la biocompatibilidad del conducto elaborado con el soporte bifásico y confirma la hipótesis de la tesis. fue la primera aproximación del grupo de investigación en el desarrollo de conductos nerviosos a nivel nacional.

9. Recomendaciones

Aunque los datos del experimento animal muestran que el conducto P3 es biocompatible, biodegradable, eficaz y seguro se debe explorar el efecto del conducto en la regeneración de nervio periférico a nivel celular y molecular. Se recomienda evaluar la adhesión y migración de fibroblastos y células inflamatorias en la zona M del conducto, así como, la capacidad de mantener los factores neurotróficos liberados por las células de Schwann y los axones de neuronas de la zona U del conducto. También, evaluar la relación de los axones regenerados con la función motora o sensorial.

10. Texto del artículo: “Adjustable conduits for guided peripheral nerve regeneration prepared from bi-zonal unidirectional and multidirectional laminar scaffold of type I collagen”



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Adjustable conduits for guided peripheral nerve regeneration prepared from bi-zonal unidirectional and multidirectional laminar scaffold of type I collagen

Diana Millán^{a,b,1}, Ronald A. Jiménez^{a,c,1}, Luis E. Nieto^e, Ivan Y. Poveda^a, Maria A. Torres^a, Ana S. Silva^d, Luis F. Ospina^f, João F. Mano^d, Marta R. Fontanilla^{a,*}

^a Tissue Engineering Group, Department of Pharmacy, Universidad Nacional de Colombia, Av. Carrera 30 # 45-10, 111321 Bogotá, Colombia

^b Universidad El Bosque, Facultad de Medicina, Colombia

^c Universidad El Bosque, Facultad de Ciencias, Colombia

^d Department of Chemistry, CICECO, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

^e Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 # 40-62 Of 726, Bogotá, Colombia

^f Department of Pharmacy, Universidad Nacional de Colombia, 111321, Av. Carrera 30 # 45-10, Bogotá, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Bi-zonal scaffolds
Collagen type I
Peripheral nerve regeneration
Schwann cells

ABSTRACT

Shortness of donor nerves has led to the development of nerve conduits that connect sectioned peripheral nerve stumps and help to prevent the formation of neuromas. Often, the standard diameters of these devices cannot be adapted at the time of surgery to the diameter of the nerve injured. In this work, scaffolds were developed to form filled nerve conduits with an inner matrix with unidirectional channels covered by a multidirectional pore zone. Collagen type I dispersions (5 mg/g and 8 mg/g) were sequentially frozen using different methods to obtain six laminar scaffolds (P1 to P5) formed by a unidirectional (U) pore/channel zone adjacent to a multidirectional (M) pore zone. The physicochemical and microstructural properties of the scaffolds were determined and compared, as well as their biodegradability, residual glutaraldehyde and cytocompatibility. Also, the Young's modulus of the conduits made by rolling up the bizonal scaffolds from the unidirectional to the multidirectional zone was determined. Based on these comparisons, the proliferation and differentiation of hASC were assessed only in the P3 scaffolds. The cells adhered, aligned in the same direction as the unidirectional porous fibers, proliferated, and differentiated into Schwann-like cells. Adjustable conduits made with the P3 scaffold were implanted in rats 10 mm sciatic nerve lesions to compare their performance with that of autologous sciatic nerve grafted lesions. The *in vivo* results demonstrated that the tested conduit can be adapted to the diameter of the nerve stumps to guide their growth and promote their regeneration.

1. Introduction

Each year, more than one million people worldwide are affected by injuries of peripheral nerves [1]. These injuries result in functional limitations and neuropathic impacts that disturb the life quality of the patients and increase costs in the health system [2–4]. Complete transection of axon and connective tissue – neurotmesis – and damage of the axons in which the continuity of connective tissue and nerve is maintained – severe axonotmesis – are treated surgically [4]. When the size of

the injury allows it, reconstructive surgical procedures like tension free end-to-end (ETE) and end-to-side (ETS) neurorrhaphies [5,6] are commonly used. The ETE procedure sutures the resulting stumps of a transected nerve, and the ETS procedure coaptates the distal stump of an injured nerve to an adjacent intact nerve [5,6]. Tension-free sutures cannot be achieved when a critical length is reached [7]. Beyond this length, sensory nerve autograft is the gold standard method to reconstruct motor sectioned nerves. In humans, gaps up to 3 cm are bridged with sensory nerve autografts [8].

* Corresponding author.

E-mail addresses: dmmillanc@unal.edu.co (D. Millán), rajimenezcr@unal.edu.co (R.A. Jiménez), luis-nieto@javeriana.edu.co (L.E. Nieto), iypovedac@unal.edu.co (I.Y. Poveda), mtorresam@unal.edu.co (M.A. Torres), sofiamsilva@ua.pt (A.S. Silva), lfospinag@unal.edu.co (L.F. Ospina), jmano@ua.pt (J.F. Mano), mfontanillad@unal.edu.co (M.R. Fontanilla).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111838>

Received 24 July 2020; Received in revised form 14 December 2020; Accepted 22 December 2020

Available online 30 December 2020

0928-4931/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Commonly, nerves from the patient's hand, arm or leg (e.g.: antebrachial cutaneous nerve, sural nerve, dorsal cutaneous nerve, superficial peroneal nerve, and posterior and lateral cutaneous) are used to reattach severed nerves [5]. Nevertheless, some major disadvantages of autografts include the morbidity of the donor site, low availability of autologous nerve, loss of sensitivity, and mismatches of diameter between the donor and recipient nerves [9]. Further, graft success may be limited by the size of the defect, donor nerve vascularization and graft fascicular architecture, among others [10]. Hence, allografts have been developed to overcome the limitation of autologous donor nerve. However, there is only one nerve allograft that has been approved by the FDA for nerve reconstruction [11]. As a consequence, nerve guidance conduits (NGCs) made of natural, synthetic and hybrid materials have been used as artificial nerve grafts when an autograft is not feasible [12]. A majority of these conduits are tubular structures designed to enclose and connect the nerve stumps of a transected nerve [12].

Collagen type I is among the natural materials used to manufacture artificial grafts [11,13–16]. This protein is the main constituent of peripheral nerve extracellular matrix, and was the first natural polymer used to manufacture NGC for peripheral nerve regeneration [17]. Most of the collagens NGCs already approved by the US Food and Drug Administration (FDA) are hollow tubular structures, which reconnect a sectioned nerve after being sutured to the proximal and distal stumps [8,18]. Still, their lack of internal microstructure in several cases hinders the axonal regrowth required to promote axon reconnection of the distal nerve stump [19].

Experimental evidence indicates that the presence of an internal matrix with unidirectionally oriented fibers impacts peripheral nerve repair mechanisms [20]. For instance, poly (acrylonitrile-co-acrylate) conduits with internal aligned fibers improved axon regeneration compared to those made with the same material but with randomly oriented internal fibers [21]. Topographical signals from poly(ϵ -caprolactone) conduits aligned by electrospinning upregulated myelin-associated glycoprotein (MAG), protein zero (PO) and myelin basic protein (MBP) genes, and promoted Schwann cell maturation [22]. Also, a microtube array sheet (MTAS) with unidirectional topography oriented the migration of Schwann cells and the extension of neurites from spinal cord and dorsal root ganglion neurons [23]. Likewise, cylindrical scaffolds with unidirectional pores obtained by punching collagen type I and elastin unidirectional sponges, and placed on contact with rat dorsal root ganglia, promoted aligned migration of axons and Schwann cells [24]. Pre-clinical evaluation of the abovementioned conduits previously seeded with Schwann cells in a rat model of sciatic nerve defect that preserved the epineural tube, showed animals recovered without signs of inflammation or neuroma formation [25]. Despite the *in vitro* and preclinical data supporting the role of unidirectional fillers in promoting guided axon growth and nerve repair [21], the FDA has approved to commercialize only one conduit made with an external matrix of collagen type I, and an internal unidirectional oriented matrix made of collagen type I and chondroitin-6-sulphate [8,16]. Present NGCs perform well when they are grafted into short gaps: in humans the accepted success rates decrease when defects are larger than 3 cm [8,10]. However, regeneration is still significantly lower than that observed with autograft controls [21]. Thus, designing and evaluating new devices that promote regeneration of peripheral nerve is still required.

Existing NGCs are manufactured with fixed diameters. Hence, mismatches between the NGC diameter and the diameter of the stumps it intends to reconnect can occur. Such mismatches are disadvantageous because a difference in nerve gauge can lead to graft failure [8]. In previous works we have described the manufacturing of aligned laminar scaffolds of collagen type I [26]. Briefly, acidic dispersions of this protein were horizontally frozen and lyophilized to obtain laminar scaffolds (10 cm²) with unidirectional pores in which cells adhered and grew aligned to the unidirectional fibers of their pores. The present work presents an absolutely new design of a laminar scaffold with two

continuous zones of differently oriented pores (unidirectional and multidirectional). Since the two zones are continuous, the scaffold can be rolled-up by the surgeon from the unidirectional to the multidirectional zone, and in this way form a conduit adjusted to the diameter of the stumps of the peripheral nerve that has been sectioned. When rolled, the unidirectional and multidirectional zones of the scaffold will respectively form the inner fill and outer sheath of the conduit. The proposed scaffold with such a unique architecture and configuration represents a new generation of conduits that might impact *in vivo* peripheral nerve regeneration.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bovine tissue used to isolate collagen type I was purchased from San Martín packing plant (Bogotá, Colombia). Ethanol 96%, ethyl ether, sodium hydroxide, sodium chloride, acetic acid glacial, isopropyl alcohol, sodium sulfite, and glycine were provided by Merck (Germany). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic solution (100 \times), MEM vitamin solution (100 \times), sodium pyruvate (100 \times) solution, trypsin, EDTA, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), phosphate-buffered saline (PBS), StemPro™ adipogenesis differentiation kit, StemPro™ chondrogenesis differentiation kit, StemPro™ osteogenesis differentiation kit, and Hank's balanced solution were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Rabbit complement (C12CC), sodium dimethyl sulfoxide (DMSO), forskolin, ninhydrin, collagenase type I, poly-L lysine, cytosine- β -arabinofuranoside hydrochloride, β -mercaptoethanol, and all-trans retinoic acid were supplied by Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Recombinant heregulin β 1, vybrant™ CFDA SE cell tracer, rabbit IgG polyclonal antibody S100b, recombinant platelet derived growth factor (PDGF-AA), recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF), and Shandon™ Cryomatrix™ embedding resin were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Rat anti-mouse Thy 1.2 antibody, rabbit IgG polyclonal p75NTR, PerCP/Cy5.5 anti-human CD105 antibody (cat. 323216), PE anti-human CD73 antibody (cat. 344004), PE/Cy7 anti-human CD45 antibody (cat. 368532), APC anti-human CD34 antibody (cat. 343608), and FITC anti-human CD90 antibody (cat. 328180) were supplied by BioLegend (San Diego, CA, USA). Goat anti-rabbit IgG H&L (FITC) was purchased from Abcam (cat. ab6717; Cambridge, MA, USA). Vectastain ABC HRP kit (peroxidase, standard), DAB peroxidase substrate kit SK-4100, antigen unmasking solution, and hematoxylin were acquired from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

2.2. Manufacturing collagen type I scaffolds and conduits

Bovine fascia bought in a certified packing plant was used to isolate the collagen. The tissue was washed, disinfected (2% sodium hypochlorite, 70% ethanol), and contaminant tissues removed. Clean tissue was cut in small pieces that were suspended in 0.5 M acetic acid, the suspension was centrifuged, and the supernatant removed. After neutralizing the supernatant (1 M NaOH) the precipitated collagen was isolated and dissolved in 0.1 M acetic acid. The resulting collagen was quantified by gravimetric analysis. For this, an aliquot of the collagen dispersion was dried (100 °C) and weighted. Once the amount of collagen present in the acetic acid dispersion was known, two collagen type I dispersions (5 and 8 mg/g collagen type I in 0.05 N acetic acid) were prepared and crosslinked with 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, and 0.10% v/v glutaraldehyde to obtain five dispersions per each concentration. The resulting dispersions were named after the glutaraldehyde concentration: P1=0.02%; P2=0.04%; P3=0.06%; P4=0.08%; and P5=0.1% v/v. A non-cross-linked dispersion was included as control (NC). These dispersions were homogenized (10.000 rpm, 10 min) with an Ultra-Turrax ® (IKA Works, China) and then shaken (120 rpm) on an orbital shaker

(Thermo Fisher, USA) for 24 h, at 37 °C. Samples were centrifuged at 400 ×g (Thermo Fisher) for 30 min to eliminate bubbles. Non-cross-linked and cross-linked dispersions were used to produce non-crosslinked (NC) and cross-linked scaffolds (P1-P5 scaffolds, respectively).

Each scaffold was prepared in two steps to ensure the unidirectional and multidirectional orientation of the pores of each of the two zones. In the first step, the unidirectional zone was made by unidirectionally freezing the 5 mg/g collagen type I dispersion following a described methodology [26]. Briefly, the dispersion was poured into molds, which had one side covered by a metallic material that, in turn, had one end immersed in liquid nitrogen to create a temperature gradient with an axial orientation. The system described above was placed in an insulated container with enclosed air temperatures between 0 and 4 °C to avoid multidirectional freezing and to maintain the unidirectional pore orientation in the entire length of the U zone. In the second step, the 8 mg/g collagen dispersion was poured in direct contact with the unidirectional zone previously obtained, and frozen (−25 °C). The differentially frozen dispersions were lyophilized (Virtis, SP Industries, USA) to produce laminar scaffolds (10 cm², 3 mm thickness) with two clearly differentiated and continuous zones: one with unidirectional and the other with multidirectional pores. The resulting sheets were cut to obtain the bi-zonal scaffolds used in the different analyses. These scaffolds were dampened and rolled-up from the unidirectional (U) to the multidirectional (M) zone to form conduits (named as the scaffolds) with an inner unidirectional scaffold and an outer multidirectional wrapping.

2.3. Microstructural characterization of the scaffolds

2.3.1. Environmental scanning electron microscopy (ESEM)

Environmental scanning electron microscopy (ESEM) of transversal and longitudinal dried non-coated samples (8 mm [Ø], 2 mm [H]) was carried out with a Tescan Vega3 system (Tescan Vega 3 SB, Czech Republic). Electron micrographs were used to qualitatively assess the interconnectivity and directionality of scaffolds' unidirectional (U), multidirectional (M), and interface (I) zones. For these analyses, three aleatory sections per scaffold were evaluated at 45× and 150× magnification [26].

2.3.2. Pore size and porosity

Cross-sections (100 µm) of U and M zones of NC and P1-P5 scaffolds were cut, hydrated with 1× PBS, and degassed to be observed under an inverted microscope (Eclipse TS100, Nikon, Japan). Digital images were captured with the NIS-Elements AR (Ver 4.50 Nikon) software, and images were analyzed using the software ImageJ 1.39u (Wayne Rasband, NIH, USA) to evaluate pore size. The major and minor axes of the ellipse that best fitted each pore were measured and their average was used to calculate the mean pore size. A total of 60 pores chosen randomly were measured for each analysis. The obtained average values were multiplied by 1.5 to take into account the effects of the pores that were not sectioned through their maximal cross-section.

A modified liquid displacement method [27] was used to assess scaffolds porosity. Briefly, samples (2 cm²) of U and M zones of NC and P1-P5 scaffolds were cut and weighted (W_1), immersed into 1× PBS (2 mL), degassed under vacuum (10 min), and incubated (37 °C, 24 h). Thereafter, samples were placed on a filter paper to remove the excess of PBS and weighed (W_2). A dry pycnometer was weighed (W_3), and the analyzed U or M sample placed into it. The pycnometer was filled with PBS until its volume (25 mL) was completed and weighed (W_4). Assays were carried out five times. The total porosity was measured using the aforementioned weights (W_1 , W_2 , W_3 , and W_4) and the density (ρ) of PBS (1.023 g/mL) according with the following equation: $P (\%) = 1 - (\rho_{\text{wet scaffold}} / \rho_{\text{collagen fibers}}) \times 100$ [28].

2.4. Physicochemical characterization

2.4.1. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The U and M zones of P1-P5 scaffolds were analyzed by FTIR. Each dried sample (2 mg) was mixed with KBr (200 mg) and compressed to obtain a pellet. The system was purged with dry air (1 h) to remove water vapor from the sample compartment. Spectra were obtained using a FT/IR-4200 spectrophotometer (Jasco, Germany), in a range of 4000–500 cm^{−1} with a resolution of 8 cm^{−1} and 150 scans/sample. The collagen type I used to manufacture the scaffolds was used as a control. Experiments were performed in triplicate.

2.4.2. Cross-linking degree, residual glutaraldehyde, and degradation

Scaffolds' cross-linking degree was related to the free amino groups of each sample, and assessed using the ninhydrin assay [29]. This assay is a destructive test of the samples, in which the free amino groups of the collagen are condensed with the hydroxyl groups of the reagent solution (containing 2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) to form Schiff bases. A standard work solution (SWS) was made by mixing (1:1) solution A (4.2 g citric acid and 1.6 g sodium hydroxide in 100 mL of type I water) and solution B (4 g ninhydrin in 100 mL ethylene glycol). Then, U and M samples (1 cm²) were covered with 500 µL of the SWS, heated (100 °C, 30 min), cooled to reach room temperature, and centrifuged (800 ×g, 5 min). The pellet was discarded, and the supernatant was mixed with 50% (v/v) isopropyl alcohol (1 mL). The absorbance of the samples was measured at 560 nm (TRIAD Multimode Detector, Dynex, USA). Considering the amino groups of non-crosslinked (NC) scaffolds as 100%, the percentage of cross-linked amino groups was calculated as the ratio between the optical absorbance of the P1-P5 samples and that of the NC samples [26]. Each analysis was carried out in triplicate.

Samples (1 cm²) were taken from zones U and M of P1-P5 scaffolds and used to evaluate the residual glutaraldehyde content. They were incubated (12 h, 60 °C) with 1 mL of a solution containing 1 M NaOH, 0.1 M glycine and 0.1 M Na₂SO₃, centrifuged (400 ×g, 5 min), and transferred (100 µL) to a 96-well culture plate. Their absorbance was read at a wavelength of 238 nm using a Dynex spectrophotometer. Data obtained was interpolated on a calibration curve previously made with known concentrations of glutaraldehyde. All experiments were carried out in triplicate.

The enzymatic degradation of scaffolds was assessed by gravimetric analysis. Samples (8 mm [Ø], 2 mm [H]) of U and M areas of the NC and P1-P5 scaffolds were weighed (W_i) and incubated (37 °C) under shaking (80 rpm) with a solution of collagenase type I (1 mL, 250U/mL) in 1× PBS for 24 h, 3, 15 and 30 days. Collagenase was changed every 5 days during the time of the assay. After removing the supernatants, the scaffolds were lyophilized for 24 h and weighted (W_f). The degradation percentage D (%) was calculated as follows: $D (\%) = 1 - (W_f / W_i) \times 100$.

2.4.3. Liquid sorption capacity, swelling, contact angle, and Zeta potential

These tests were carried out with the scaffolds. Liquid sorption capacity (LSC) was evaluated gravimetrically. Samples (2 cm²) of U and M zones of NC and P1-P5 scaffolds were weighted (W_i) and immersed in 1× PBS (pH 7.4) for 24 h at 37 °C. Then, hydrated samples were placed on Whatman paper to remove PBS excess and weighted (W_f). Experiments were carried out five times. The liquid sorption capacity was calculated as follows: $LSC (\%) = (W_f - W_i) / W_i \times 100$.

Swelling of the same samples used to assess LSC was calculated by measuring the scaffolds volume change after being immersed in PBS. The width, height, and length of dry U and M areas (2 cm²) of NC and P1-P5 scaffolds were measured with a stainless hardened caliper digital (Mitutoyo, Aurora, IL, USA) to obtain the volume of dry samples (V_d). Afterward, the V_w value calculated during the porosity evaluation of the scaffolds was used to determine their swelling percentage (S%) as follows: $S (\%) = (V_w / V_d) \times 100$.

Scaffolds' dynamic contact angle was measured using the captive

bubble method with an automated Contact Angle Goniometer (Raméhart Instrument Co., NJ, USA). After hydrating the U and M samples (1cm^2) of P1-P5 scaffolds in supplemented DMEM (24 h, room temperature), each sample was fixed in the holder of the device and submerged in DMEM. Then, air ($6\ \mu\text{L}$) was injected beneath the sample's surface, and digital images of the forming bubble were taken. Each evaluation was repeated three times.

The electric surface potential (Zeta potential) of U and M zones of P1-P5 scaffolds was measured with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Samples ($0.2\ \text{g}$) were placed in $2\ \text{mL}$ of PBS ($20\ \text{mM}$, pH 7.4) for 12 h and homogenized with an ultra-turrax homogenizer system (IKA 3737001 T10 basic, Cole-Palmer, UK) at $3000\ \text{rpm}$ for 10 min. Five measurements were made per scaffold (100 runs each) at $25\ ^\circ\text{C}$.

2.4.4. Conduits tensile properties

Scaffolds ($4\ \text{cm}^2$) wetted in culture medium (DMEM) for 24 h were rolled from the unidirectional to the multidirectional zone to form conduits that had the unidirectional zone inside and the multidirectional zone outside. Each zone had the same area. The Young's modulus of the resulting NC (non-cross-linked control) and P1-P5 conduits was determined with a traction assay carried out in a micro material testing machine (MMT, Shimadzu), equipped with a $101\ \text{N}$ load cell, at a speed of $1.0\ \text{mm/min}$ until the conduits ruptured. Samples were stretched in the direction of the unidirectional pores. The Young's modulus of the conduits was calculated from the slope of the stress-strain curves. Three measurements per each sample were made.

2.5. Cytocompatibility evaluation

2.5.1. Isolation and purification of Schwann cells

Schwann cells were isolated and cultured following described protocols [30,31]. The sciatic nerves of 10–12 pup mice (2–5 days old) were dissected, cleaned, excised, and placed ($40\ \text{min}$ at $37\ ^\circ\text{C}$) into culture plates containing 0.25% trypsin and 0.1% collagenase type I in DMEM without Fetal Bovine Serum (FBS). The enzymatic digestion was halted by adding 40% FBS in Hank's balanced solution; the suspension was centrifuged ($400\times\ \text{g}$, $10\ \text{min}$). The cell pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, $100\ \text{IU/mL}$ penicillin, $100\ \mu\text{g/mL}$ streptomycin, and $0.5\ \mu\text{g/mL}$ amphotericin B, and then poured in culture plates ($35\ \text{mm}$ diameter) pre-coated with poly-L lysine. After incubating for 24 h ($5\% \text{CO}_2$, $37\ ^\circ\text{C}$), medium was replaced with DMEM supplemented with $10\ \mu\text{M}$ cytosine- β -arabino-furanoside hydrochloride, cultures incubated for an additional 48 h, and medium replaced by complete DMEM supplemented with $10\ \text{nM}$ heregulin $\beta 1$ and $2\ \mu\text{M}$ forskolin [31]. Complement-mediated killing was carried out to eliminate contaminating fibroblasts. For this, cultured cells were scraped, centrifuged ($400\times\ \text{g}$, $10\ \text{min}$), resuspended in $60\ \mu\text{L}$ of rat IgG anti-mouse Thy 1.2, and incubated ($30\ \text{min}$, $37\ ^\circ\text{C}$). Then, rabbit serum was added and cells were incubated for an additional $60\ \text{min}$ ($37\ ^\circ\text{C}$). After this time, they were washed three times with PBS and cultured with DMEM supplemented with $5\ \text{ng/mL}$ PDGF-AA, $10\ \text{ng/mL}$ bFGF, $10\ \text{nM}$ heregulin- $\beta 1$ and $2\ \mu\text{M}$ forskolin (Schwann cell induction medium) [32] until 80% of confluence was reached. Isolated cells were characterized using rabbit polyclonal IgG antibody S100b (1:50) and secondary goat anti-rabbit IgG H&L (FITC) (1:100). Positive cells in 5th or 6th passage were used in all experiments.

2.5.2. Isolation and characterization of human adipose stem cells (hASC)

Stem cells derived from human adipose tissue (hASC) were isolated from a healthy young donor lipos aspirate with signed informed consent. Primary cultures were obtained by modifying a described methodology [33]. Briefly, tissue ($3\ \text{g}$) was incubated ($1\ \text{h}$, $37\ ^\circ\text{C}$) with $10\ \text{mL}$ of collagenase type I ($2\ \text{mg/mL}$) in DMEM serum-free. After digestion, DMEM supplemented with 10% FBS was added, and the sample was filtered with a cell strainer ($70\ \mu\text{m}$). The resulting suspension was centrifuged ($300\times\ \text{g}$, $10\ \text{min}$), the pellet was resuspended, and cells

seeded ($5\times 10^3\ \text{cells/cm}^2$) in DMEM supplemented with FBS ($10\% \text{v/v}$), penicillin ($100\ \text{IU/mL}$), streptomycin ($100\ \mu\text{g/mL}$), amphotericin B ($0.5\ \mu\text{g/mL}$), and incubated ($5\% \text{CO}_2$, $37\ ^\circ\text{C}$). The medium was changed every third day until culture reached 80% of confluence. For cell expansion, cultures were sub-cultured three times using the same medium.

Third passage cells were scraped (0.25% trypsin, 0.025% EDTA) and the resulting suspension centrifuged ($300\times\ \text{g}$, $10\ \text{min}$). Samples ($5\times 10^4\ \text{cells/mL}$) were taken, incubated ($30\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ in the dark) with an antibody (PerCP/Cy5.5 anti-human CD105, FITC anti-human CD90, PE anti-human CD73, PE/Cy7 anti-human CD45, APC anti-human CD34), and washed three times with $1\times\ \text{PBS}$ to evaluate their cell surface protein profile (positive CD105, CD90, CD73, negative or low expression CD45 and CD34). Each sample was analyzed by FACSscan BD flow cytometry, recording $20,000$ events per sample. Adhesion to the culture plate and differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts were also assessed. For differentiation analyses StemPro™ (adipogenesis, chondrogenesis, and osteogenesis) differentiation kits were used, following the manufacturer's specifications. Oil Red O (7–14 days); alcian blue (14 days); alkaline phosphatase (7 days) and alizarin red S (21 days) were used to confirm differentiation.

2.6. Immunohistochemical evaluation

Scaffolds seeded with primary Schwann cells ($2\times 10^5/\text{cm}^2$) and incubated for 14 days were fixed with 4% paraformaldehyde (pH 7.4; $4\ ^\circ\text{C}$; $24\ \text{h}$), washed with $1\times\ \text{PBS}$, dehydrated, and embedded in paraffin. Samples were sectioned ($6\ \mu\text{m}$), deparaffined ($60\ ^\circ\text{C}$), and rehydrated. The antigenic recovery was made using antigen unmasking solution for $30\ \text{min}$. Samples were incubated individually with rabbit polyclonal IgG antibody S100b (1:200), and rabbit polyclonal IgG p75NTR (1:250) for $1\ \text{h}$ at room temperature. Thereafter, they were washed three times and processed with Vectastain ABC kit peroxidase rabbit IgG following manufacturer's indications. Antigens were detected with DAB peroxidase substrate kit, and samples were counterstained with hematoxylin. Stained slides were observed under a light microscope (Nikon ECLIPSE 55i, Nikon, Tokyo, Japan).

2.7. Cytocompatibility evaluation

The cytocompatibility of the scaffolds was assessed by evaluating their cytotoxicity on RSC96 and primary Schwann cells and by monitoring the proliferation of primary Schwann cells and primary hASC seeded in the scaffolds. The cytotoxicity of NC and P1-P5 scaffolds was evaluated following ISO 10993-5 [34]. The cell line RSC96 (ATCC® CRL2765™) and primary Schwann cells were seeded in 96-well plates ($1\times 10^4\ \text{cells}/100\ \mu\text{L}$ medium) and incubated ($37\ ^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$, $24\ \text{h}$) in supplemented DMEM. Then, the culture medium was replaced by extraction medium (DMEM pre-incubated for $24\ \text{h}$ with $1\ \text{cm}^2$ of each scaffold and sterilized by filtration) and cells incubated ($37\ ^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$, $24\ \text{h}$). Sterile DMEM supplemented with 25% DMSO and DMEM incubated with $0.2\ \text{g/mL}$ silicone were used as positive and negative controls, respectively. Medium was removed, $50\ \mu\text{L}$ of MTT ($1\ \text{mg/mL}$) was added and samples were incubated for $2\ \text{h}$ ($37\ ^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$). After discarding the MTT, isopropanol ($100\ \mu\text{L}$) was added, and the absorbance measured at $570\ \text{nm}$ (TRIAD Multimode Microplate Reader).

For Schwann cell proliferation experiments, cells ($2\times 10^5/\text{cm}^2$) were seeded in the U zone of the scaffolds and incubated ($5\% \text{CO}_2$, $37\ ^\circ\text{C}$) for 24 h, 7 and 14 days with DMEM (supplemented with 10% (v/v) FBS, antibiotic-antimycotic, MEM vitamin solution, sodium pyruvate solution, $10\ \text{nM}$ heregulin- $\beta 1$, and $2\ \mu\text{M}$ forskolin) [31]; medium was changed every three days. A vibrant® MTT kit was used where the incubation time suggested by the manufacturer was modified from $4\ \text{h}$ to $3\ \text{h}$. The formazan produced was solubilized with dimethyl sulfoxide (DMSO) and the absorbance of the samples was measured at $570\ \text{nm}$ (Dynerx Technologies). Cell distribution and alignment in the scaffolds

were evaluated with a vybrant™ CFDA SE cell tracer, following the manufacturer's specifications.

For the hASC proliferation experiments cells (2.0×10^4) were seeded in the U zones of the P3 scaffolds (8 mm [Ø], 2 mm [H]), which then were divided into two groups. Group I was incubated (5% CO₂, 37 °C) with DMEM supplemented with 10% FBS for 14 days changing medium every third day. Group II was incubated (5% CO₂, 37 °C) with DMEM supplemented with 1 mM β-mercaptoethanol (Schwann cell pre-induction medium) for 24 h, medium removed, cells washed with 1 × PBS and incubated (5% CO₂, 37 °C) with Schwann cell induction medium [32]. The induction medium was changed every third day, and proliferation at 24 h, 7, and 14 days evaluated using the Vibrant® MTT kit.

2.8. Animal experiment

Animals used were manipulated following the ARRIVE guidelines of the National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research [35]. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Sciences of the Universidad Nacional de Colombia (Act 07-2015). Twenty-one male Wistar rats (12 wk.; 250 g), were randomly divided into three groups, of 7 animals. For the procedure, each animal was anesthetized (peritoneal injection of ketamine, 70 mg/kg; xylazine, 10 mg/kg) and at random a thigh was chosen, shaved, and cleaned with ethanol (70%) before making an incision in the skin without affecting muscles. Once exposed, the sciatic nerve was transected to remove a segment of 10 mm. In the first group (I) of animals, the segment of the severed nerve was inverted and reimplanted. In the second group (II), a conduit made with a P3 scaffold pre-moistened with PBS was attached to the nerve stumps with fibrin sealant (Tissel, Baxter) and sutured (ethilon 9-0 epineural round tip). In the third group (III), the sciatic nerve gap was left unbridged. A plastic surgeon and two veterinaries carried out the surgeries. Thereafter, animals were kept in individual cages with food and water *ad libitum* and tramadol (5 mg/g) was injected subcutaneously to control the animal pain. Evaluation of pain, stress, and distress produced by the surgical procedure was carried out according to published guidelines [36]. Healing was monitored by assessing the signs described in the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [37]. The animals were sacrificed 12 weeks after grafting.

2.9. Walking track analysis

Following a described methodology [38], a walking track analysis was carried out at weeks 4, 8, and 12 to calculate the sciatic functional index (SFI). For each animal, the footprints of both the grafted (E) and normal (N) limbs were digitalized and measured using the ImageJ program. The distances from the heel to the tip of the third toe (print length-PL), the first to the fifth toe (toe spread-TS), and the fourth to the second toe (intermediary toe spread-ITS) were measured and the SFI was calculated according to the following equation: $SFI = -38.33((EPL - NPL) / NPL) + 109.5((ETS - NTS) / NTS) + 13.3((EITS - NITS) / NITS) - 8.8$ [38]. In these test SFI values equal to 0 and -100 correspond to non-injured and completely transected sciatic nerves, respectively.

2.10. Muscle-mass ratio and Masson's Trichrome staining

Once the animals were sacrificed, the gastrocnemius muscle of the implanted thigh and that of the non-implanted thigh were dissected and fixed (4% paraformaldehyde, 24 h) to assess the muscle-mass ratio. For this, wet muscles of injured (Wi) and healthy contralateral sides (Wh) were weighed after removing the excess of paraformaldehyde and the ratio Wi/Wh was determined [39]. For the histological evaluation of muscle atrophy, the gastrocnemius muscle fragments (5–8 mm) were dehydrated, embedded in paraffin, and processed with a microtome to

obtain cross-sections (5 μm) that were stained with Masson's Trichrome. Sections were observed under the light microscope (Olympus BX51).

2.11. Axonal density, diameter and myelin sheath thickness

For the histomorphometric analysis, the nerves were fixed with glutaraldehyde (4%, 24 h) and the areas of the nerve near the distal coaptation site were transversely cut into thin sections (1 mm). The contralateral uninjured nerve served as normal control. Sections were fixed with osmium tetroxide (1%, 2 h), dehydrated, embedded in Epon resin, and the blocks processed to obtain sections of 1 μm of thickness, which were stained with 1% toluidine blue [40]. The images were captured, digitized, and analyzed with the ImageJ program to determine axonal density, axon diameter, and myelin sheath thickness. In addition, nerves randomly chosen from each group were fixed with paraformaldehyde (4%), washed, embedded in Cryomatrix, frozen, and cut lengthwise (5 μm) with a cryostat. Slides were observed under a fluorescent microscopy (100×) (Olympus BX51) at a wavelength of 495 nm to visualize the longitudinal arrangement of the fibers of the repaired axons.

2.12. Statistical analysis

Data are shown as the mean ± the standard deviation (SD). A one-way ANOVA test was used to evaluate differences between the samples, which were significant when $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Macroscopic appearance of scaffolds

The macroscopic appearance and ESEM analysis of the laminar bizonal scaffolds are shown in Fig. 1. A scaffold diagram shows the general organization and pore orientation of the U, I and M regions of the roll-up sheet (Fig. 1A). The stereoscopic observation of cross-linked scaffolds confirmed the presence of U and M continuous zones, each with different pore orientations (Fig. 1B). Scaffolds were moistened with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) -which is red- in order for them to fold from the unidirectional to the multidirectional zone. On account of this the conduit formed with an axially oriented internal filler wrapped by the scaffolds' zone with multidirectional pores turned red (Fig. 1C). The size of a laminar scaffold is 10 cm². One sheet can be cut to obtain several 1 cm² scaffolds with two clearly differentiated and continuous U and M zones. Once moistened, these scaffolds can be folded and adjusted according to the diameter of the nerve stumps (Fig. 1D).

3.2. Environmental scanning electron microscopy (ESEM) of scaffolds

Representative ESEM images of U and M zones of NC and P1-P5 scaffolds are shown in Fig. 2. In all cases, the longitudinal sections clearly evidenced the continuity of the U and M zones (Fig. 2A). This continuity was also observed in the cross-sections of these scaffolds (Fig. 2B). All the cross-sections of the scaffolds presented well-defined pores in their U zones, apparently, with larger size than those in the M zones. This later zone also appeared to have higher fiber density than the U zone. The enlarged view of the M zone cross-sections of all scaffolds (Fig. 2C) showed pores that were heterogeneously shaped and, apparently, with low interconnectivity. The enlarged view of the U zones showed pores with a more homogeneous shape (Fig. 2D). Continuous channels were observed in the longitudinal sections of all U zones (Fig. 2E).

3.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The results of the FTIR analysis of the scaffolds are shown in Fig. 3.

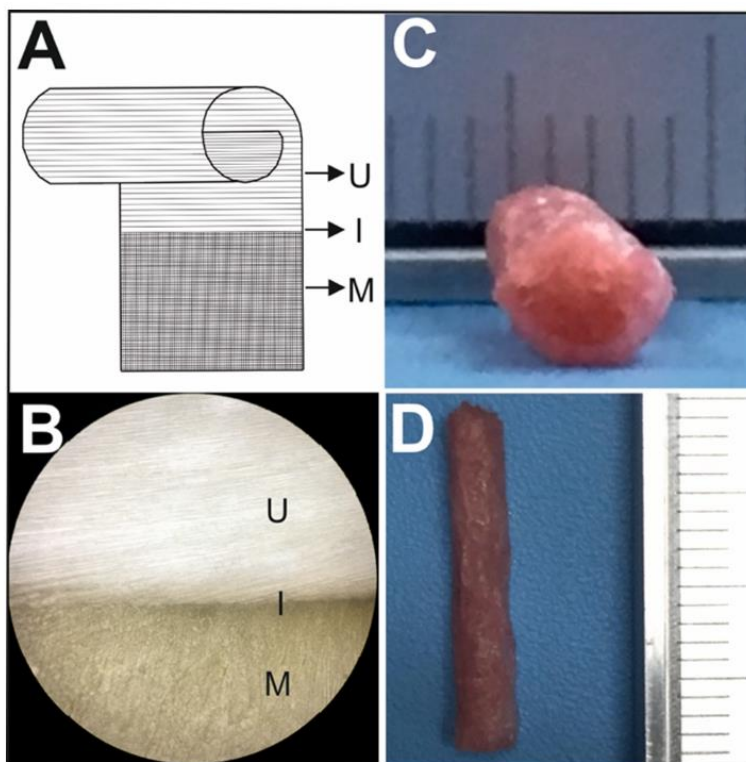


Fig. 1. Macroscopic appearance of the scaffold and conduit. (A) Diagram of the laminar roll-up scaffold. (B) Stereoscopic image of the scaffolds U and M continuous zones. (C) Cross-section of a conduit made from bi-zonal laminar scaffolds. (D) Longitudinal image of conduit. U: unidirectional zone; I: interface zone; M: multi-directional zone.

The spectra of all samples show the characteristic signals of the type I collagen included as a control (C), confirming that conduit manufacturing does not denature native collagen. The observed absorbance peaks are amide-A (N-H stretch) at 3334 cm^{-1} (M zones) and at 3307 cm^{-1} (U zones); amide-I (C=O stretch) at $\approx 1660\text{ cm}^{-1}$ (M zones) and 1654 cm^{-1} (U zones); amide-II (C-N stretch, N-H bend combination) at $\approx 1557\text{ cm}^{-1}$ (M zones) and 1551 cm^{-1} (U zones), amide-III (C-N stretch, N-H bend, C-C stretch) at $\approx 1239\text{ cm}^{-1}$ for both zones. In contrast, gelatin spectrum was different.

3.4. Pore size and porosity

Pore size data from wet scaffolds (Fig. 4) indicates that the dispersion of the pore size was greater in the M zones than in the U zones, also, that there were no significant differences between the pore size of both zones (Fig. 4A, B). The value range for the M zones was $100\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$ with an average of $286.6 \pm 129\text{ }\mu\text{m}$, while the range for the U zone was $100\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$ with an average of $211.3 \pm 100\text{ }\mu\text{m}$. In addition, the differences between the mean pore size of the M and U zones were significant ($p = 0.00269 \times 10^{-6}$). The evaluation of porosity is presented in Fig. 4C. Both zones are highly porous, however, the porosity, although not significantly different, was higher in zones M (>90%) than in zones U (>80%). Moreover, porosity was not affected by the concentration of the cross-linking agent and was similar to the porosity of the NC scaffolds.

3.5. Cross-linking degree, residual glutaraldehyde, and enzymatic degradation of the scaffolds

The assessment of the free amino groups in each scaffold was used to indirectly measure their cross-linking percentage (Fig. 5A). The U zone of the P1-P3 scaffolds – made with the collagen dispersion of 5 mg/g and cross-linked with the lower concentrations of glutaraldehyde (0.02 and 0.04 v/v) – showed significantly higher ($p < 0.05$) cross-linking degree than the M zones of these scaffolds, that were made with the collagen dispersion of 8 mg/g . When 0.06 , 0.08 and 0.1% glutaraldehyde was used there were no significant differences between the cross-linking percentages of the U and M zones of the scaffolds, and the cross-linking degree did not increase when glutaraldehyde concentration was increased. Comparison of the cross-linking percentages of the U zones shows that there were significant differences between NC and P1 and P2-P5 scaffolds, and no differences between P2-P5 scaffolds. When the M zones were compared there were significant differences between NC, P1, and P2 with P3-P5 scaffolds, and no differences were found between P3-P5 scaffolds.

The multidirectional P1 and P2 samples did not have residual glutaraldehyde, and the P3-P5 samples had less than $6.0 \times 10^{-4}\text{ mg}$ glutaraldehyde/mg scaffold. Residual cross-linker increased when glutaraldehyde increased, and the cross-linker concentration in the M zones was significantly lower ($p < 0.05$) than in the U zones for all the scaffolds (Fig. 5B). In the U zones of P1-P5 scaffolds residual glutaraldehyde increased and was higher than that observed in the M zones.

Fig. 5C and D, respectively, shows the percentage of degradation of M and U zones. Both zones of the NC scaffolds were fully degraded after

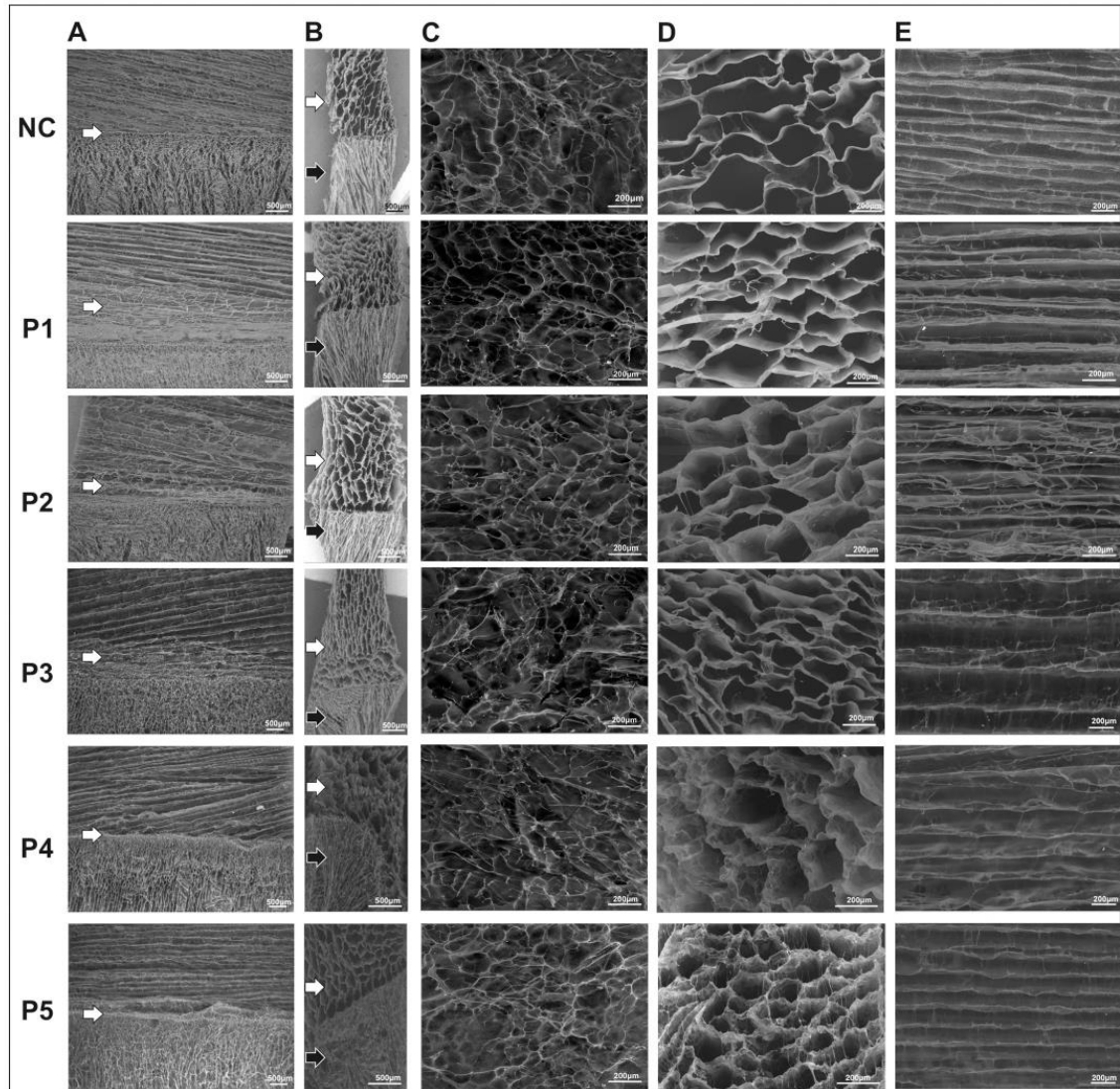


Fig. 2. ESEM evaluation of the scaffolds. Representative images of non-cross-linked (NC) and cross-linked P1-P5 scaffolds. (A) Longitudinal sections. (B) Cross-sections. (C) Enlarged cross-sections of scaffolds' M zones. (D) Enlarged cross-sections of scaffolds' U zones. (E) Enlarged longitudinal-sections of scaffolds' U zones. Arrows point the interphase between the scaffolds' U and M zones. Scale bars: 500 and 200 μm .

24 h of digestion oppositely to the cross-linked P1-P5 scaffolds. In fact, most of the M zones of the P1 scaffolds degraded completely in 30 days, while the U zones of these scaffolds did so after 14 days. Also, the degradation percentages of the M zones of the P1 scaffolds were not significantly different ($p > 0.05$) from those of the M zones of the P2 scaffolds. However, the degradation percentages of the U zones of the P1 scaffolds were significantly ($p < 0.05$) higher than those of the U zones of the P2 scaffolds. At the same time, the degradation percentage of both zones of P3-P5 scaffolds were the lowest. On day 30, the percentage of degradation of these M scaffold zones was between approximately 45% and 65%, and that of the U zones was between approximately 45% and 50%. In general, the data indicates that at 30 days the U zones of the P3-P5 scaffolds degraded less than the M zones; also, that this degradation

decreased when the concentration of cross-linker increased.

3.6. Liquid sorption capacity, swelling, contact angle, and Zeta potential

Table 1 shows the liquid sorption capacity (LSC) of PBS, swelling (S), contact angle (CA), and Zeta potential of NC and P1-P5 (M and U zones) samples. The LSC was significantly higher ($p < 0.05$) for the M zones than for the U zones in all scaffolds; it was also higher for P1-P5 than for the NC scaffolds. This parameter did not vary with the concentration of glutaraldehyde used as cross-linker because there were no significant differences ($p > 0.05$) between P1-P5 scaffolds. The swelling percentage of P1-P5 scaffolds was higher, in both zones, than in those of the NC scaffolds.

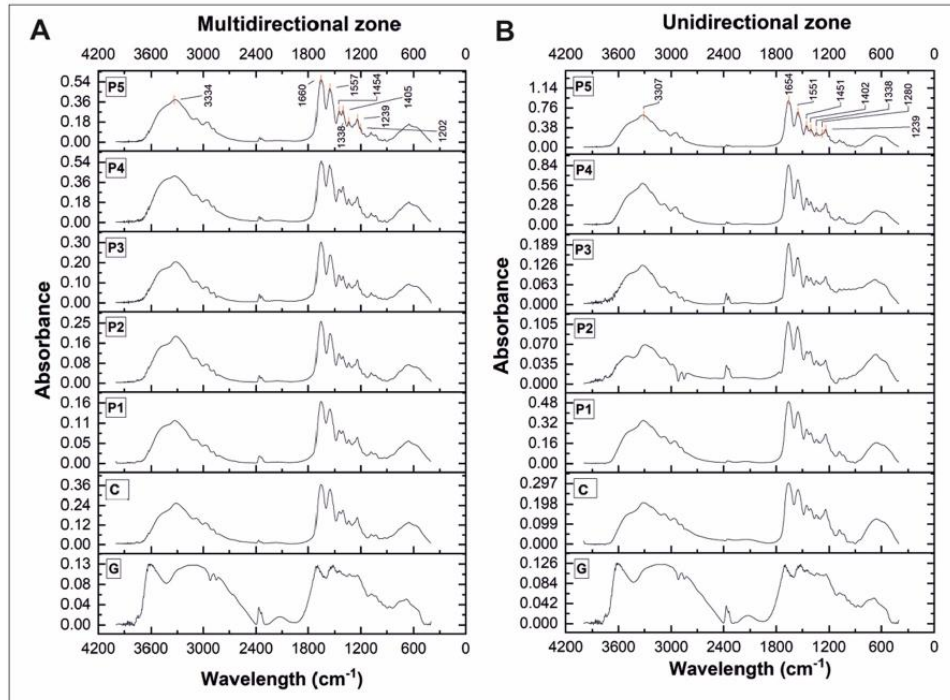


Fig. 3. FTIR analysis of the scaffolds. (A) Multidirectional zones. (B) Unidirectional zones of P1-P5 scaffolds. In both analyses collagen type I (C) and gelatin (G) were used as controls.

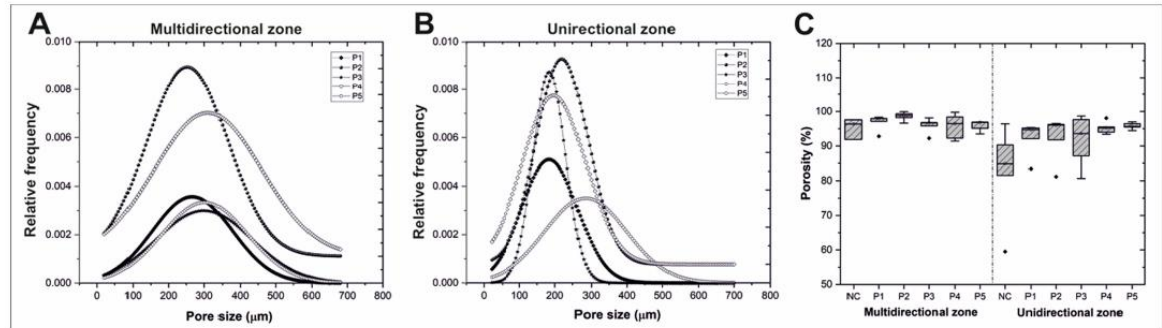


Fig. 4. Pore size distribution and porosity of the cross-linked scaffolds. (A) Pore size dispersions of the multidirectional -M- zones. (B) Pore size dispersions of the unidirectional -U- zones. (C) Porosity.

The assessment of the contact angle showed CA values above 50° and below 90° for all scaffolds, and no significant differences between M and U zones of the scaffolds. The Zeta (Z) potential of the controls, in both zones, was significantly ($p < 0.05$) higher than that of the P1-P5 scaffolds. This parameter was higher in both zones of P1 samples than in those of the P2-P5 scaffolds. Negative values were only seen in the M zones of P3-P5, and there was no significant difference ($p > 0.05$) between them. In P2-P5 scaffolds, the Z potential of the M zone was significantly ($p < 0.05$) lower than that of the U zone.

3.7. Tensile properties of the conduits

The evaluation of tensile stress-strain experiments (Fig. 6) indicated

that Young's modulus of the conduits prepared with the P1-P5 scaffolds increased when the concentration of the glutaraldehyde used as cross-linker increased. The Young's modulus values found were 0.027, 0.064, 0.230, 0.437, 0.876 and 0.983 MPa, respectively. Young's modulus of conduits made with NC, P1, and P2 scaffolds was not significantly different; however, conduits made with scaffolds P3, P4, and P5 had higher ($p < 0.05$) Young's modulus than the NC control.

3.8. Microscopic and immunohistochemical evaluation of Schwann cell cultures

A representative image of primary Schwann cell cultures shows spindle-shaped cells, mostly with small bodies (Fig. 7A). Moreover,

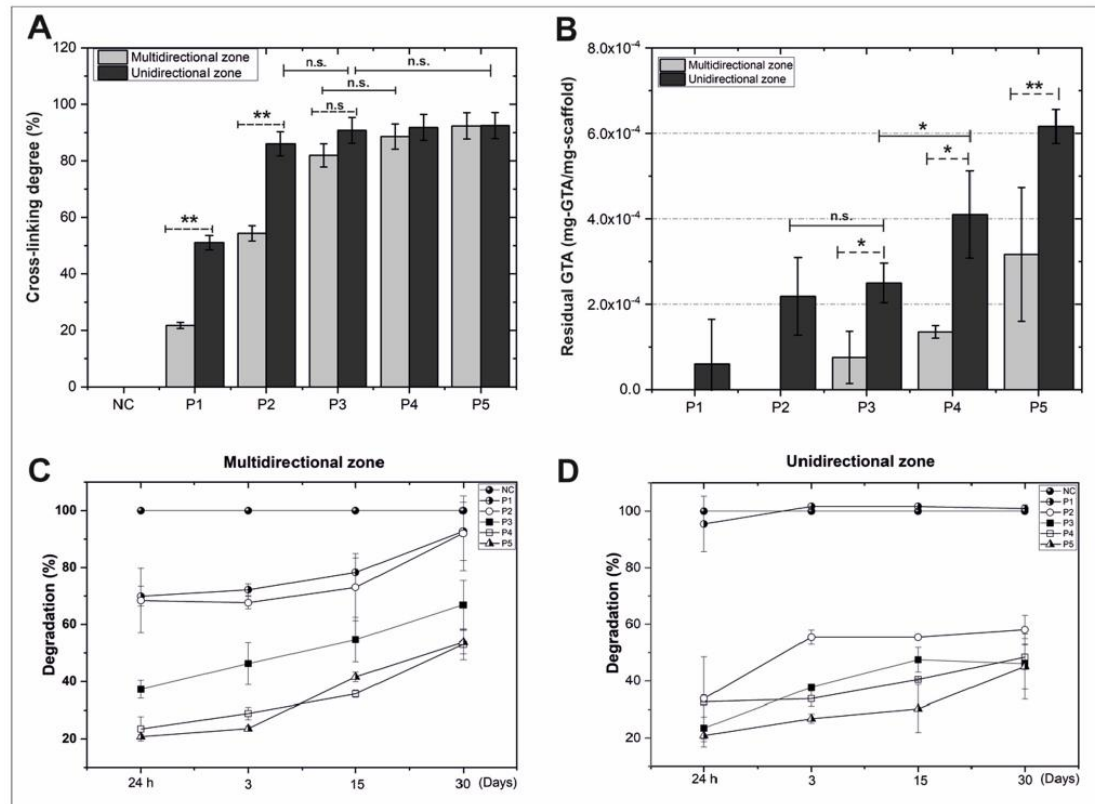


Fig. 5. Assessment of cross-linking percentage, residual glutaraldehyde, and percentage of degradation of the scaffolds. (A) Cross-linking percentage. (B) Residual glutaraldehyde. (C) Degradation percentage of NC (non-cross-linked), and cross-linked (P1-P5) scaffolds. Significant differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns.: $p > 0.05$.

Table 1
Liquid sorption capacity, swelling, contact angle, and Zeta potential.

	NC	P1	P2	P3	P4	P5
Multidirectional zone						
Liquid sorption capacity (%) ^a	2283.2±433.3	5803.6±210.1	5662.2±340.0	5184.9±200.1	5688.3±118.9	5035.0±213.0
Swelling (%) ^a	39.9±9.9	108.0±5.1	115.6±10.0	109.1±9.6	103.8±3.7	108.18±16.85
Contact angle	63.9±4.8	53.4±0.9	62.3±9.6	76.5±6.6	70.04±6.3	72.30±7.9
Z potential (mV)	9.5±1.0	7.0±1.9	0.8±2.0	-0.8±1.0	-0.1±1.2	-1.3±1.6
Unidirectional zone						
Liquid sorption capacity (%) ^a	20.3±4.3	56.0±5.6	62.1±5.2	60.9±4.9	61.8±5.8	60.1±7.9
Swelling (%) ^a	31.2±8.2	94.2±12.0	111.3±11.1	96.5±11.6	115.1±10.1	99.1±7.9
Contact angle	62.9±9.1	50.0±9.2	76.58±12.16	73.3±9.7	81.7±8.6	72.3±6.8
Z potential (mV)	9.8±0.3	8.3±0.7	1.3±2.0	1.1±1.0	3.8±1.2	1.3±0.6

^a There were no significant differences ($p > 0.05$) between M zones of P1 to P5 scaffolds and between the U zones of these scaffolds.

immunolabelled cultures confirm the presence of spindle-shaped cells S100b positive (Fig. 7B). The *in vitro* tracing of cells labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA) seeded in the U zone of P1-P5 scaffolds confirmed the adhered cells were aligned with the unidirectional collagen type I fibers. Immunolabelling demonstrated the seeded cells were S100b and p75 positive, and their adhesion to fibers of the unidirectional zones of the scaffolds (Fig. 7C).

3.9. Isolation and differentiation of human adipose stem cells

Inverted microscope analysis of isolated hASC incubated with DMEM

demonstrated the presence of fusiform and polygon shaped cells adhered to the culture plate, osteogenic differentiation and cell differentiation to adipocytes, chondrocytes. The immunophenotype measured by flow cytometry showed that only 2.5% and 5.1% of cells were positive for CD 34 and CD45, respectively. Also, that 99.8%; 99.1%; and 71.8% of the isolated cells were positive for CD73, CD90, and CD105, respectively (Supplementary material, Fig. 1).

3.10. Evaluation of cytocompatibility

The cytocompatibility of the scaffolds was assessed by evaluating

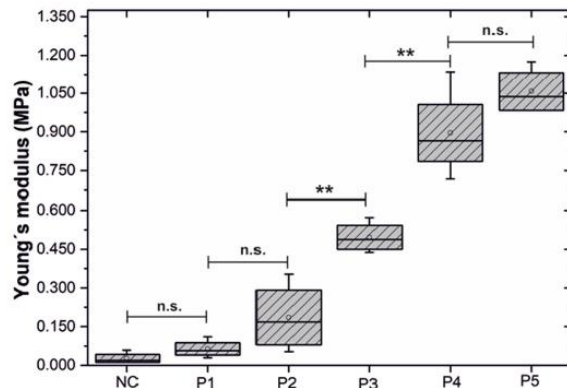


Fig. 6. Young's modulus of the conduits prepared with the cross-linked scaffolds (P1-P5) obtained from tensile experiments. Significant differences: ** $p < 0.01$; n.s.: $p > 0.05$.

their cytotoxicity on RSC96 and primary Schwann cells, and by measuring the proliferation of primary Schwann cells and hASCs in the scaffolds (Fig. 8). The RSC96 cells - incubated with extracts from a negative control (silicone) and all the scaffolds - showed viability percentages higher than 70% of the blank viability (RSC96 cells cultured with supplemented DMEM). On the contrary, the viability was below 8% when they were incubated with the positive control extract (DMSO) (Fig. 8A). Primary Schwann cells incubated with negative control and NC and P1-P3 extracts showed viability percentages above 70%; however, when incubated with positive control and P4 and P5 extracts, they had viability percentages below 60% (Fig. 8B).

The proliferation of primary Schwann cells in the U zone of P1, P2 and P3 was significantly higher ($p < 0.05$) than in the U zone of the P4 and P5 scaffolds at 7 days. Additionally, no significant differences were found between P1, P2 and P3 ($p > 0.05$). On day 14 the number of cells in scaffolds P1, P2, and P3 were not significantly different from the number of cells counted on day 7 ($p = 0.078$; $p = 0.69$; $p = 0.58$, respectively). However, it was significantly different from day 7 in the P4 and P5 scaffolds (Fig. 8C).

The proliferation of primary hASCs, with or without the Schwann cell induction medium, was only assessed in the P3 scaffold because it was the only one that was partially degraded at 30 days and at the same

time it was cytocompatible with the RSC96 cell line and primary Schwann cells. The proliferation of primary hASCs seeded in the U zone of the P3 scaffolds was significantly higher ($p < 0.05$) with the Schwann cell induction medium than that observed without it. The number of hASCs increased significantly ($p = 1.9 \times 10^{-6}$) on day 14 compared to day 7 of culture with the induction medium, and on day 7 compared to day 3 in the cultures made without it (Fig. 8D). The hASCs cultured with or without Schwann induction medium and stained with DAPI and S100b antibody are shown in Fig. 8E. The hASCs cultured in DMEM were S100b negative, while those cultured in the Schwann induction medium were S100b positive. Furthermore, cells appeared aligned along the unidirectional collagen fibers of the P3 scaffold.

3.11. Animal experiment

Animal footprints and surgical images of the healthy sciatic nerve, autograft, P3 grafted nerve, and sectioned sciatic nerve - the day of surgery and after 12 weeks - are shown in Fig. 9. This figure also presents microscopic images of the repaired nerves and the gastrocnemius muscle. The footprints of the control (Fig. 9A), autograft (Fig. 9B), P3 conduit-grafted (Fig. 9C) and non-grafted (Fig. 9D) animals indicate that all, except the controls, had flexion and toe contracture and that this contracture was more noticeable in the non-grafted rats. Although animals grafted with the P3 conduit did not fully extend the toe, they showed less contracture and an increase in toe extension similar to that seen in the autograft group at 8 and 12 weeks after surgery.

Images were taken before and after implantation to follow the appearance of the sciatic nerve. Fig. 9E shows a sciatic nerve before surgery. Images of the sciatic nerves bridged with the autograft (Fig. 9F), the P3 conduit (Fig. 9G), and non-grafted (9H) were captured during the surgeries. Twelve weeks later, when the experiment was concluded, the autograft coapted the stumps of the transected nerve (Fig. 9I), and in the animals grafted with the P3 conduit it was remodeled and replaced with nerve tissue similar in diameter to the distal stump and autologous grafted nerve (Fig. 9J). As expected, disorganized neural sprouts that did not reach the distal stump were observed in the non-grafted rats (Fig. 9K).

The histological analysis of the dissected nerves showed uniform myelinated axons with large diameters in the healthy nerve used as a control (Fig. 9L). In the autograft (Fig. 9M) and in the nerve grafted with the P3 conduit (Fig. 9N) myelinated axons of medium and small diameter were seen, grouped in small bundles and distributed along the cross-section of the nerve. However, in P3-grafted nerve, the asymmetry of the

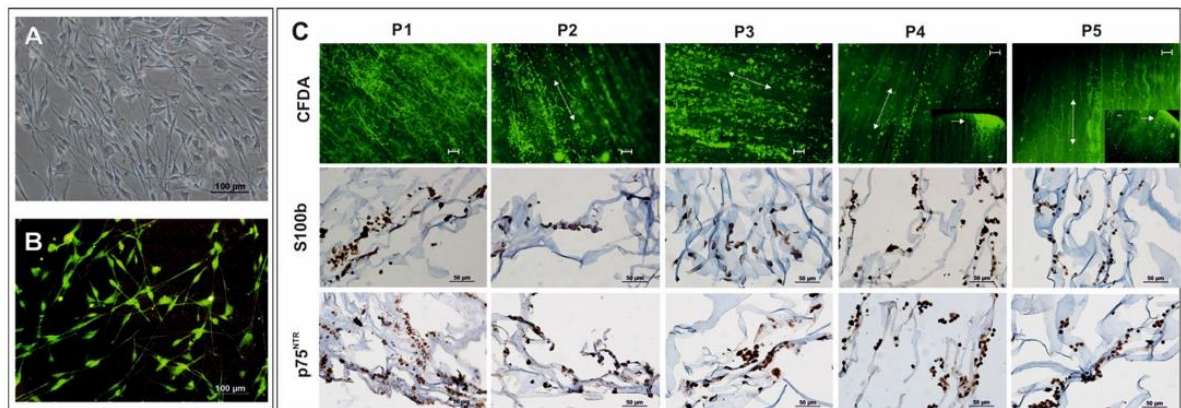


Fig. 7. Microscopic and immunohistochemical evaluation of Schwann cell cultures. (A) Primary Schwann cells. (B) Culture of Schwann cells S100b immunolabelled. (C) Schwann cells seeded in the unidirectional (U) zone of cross-linked scaffolds stained with vybrant™ CFDA, and immunolabelled with anti-S100b and p75^{NTR} antibodies. Dashed arrows point oriented pore/channels. Scale bars: 50 and 100 μm .

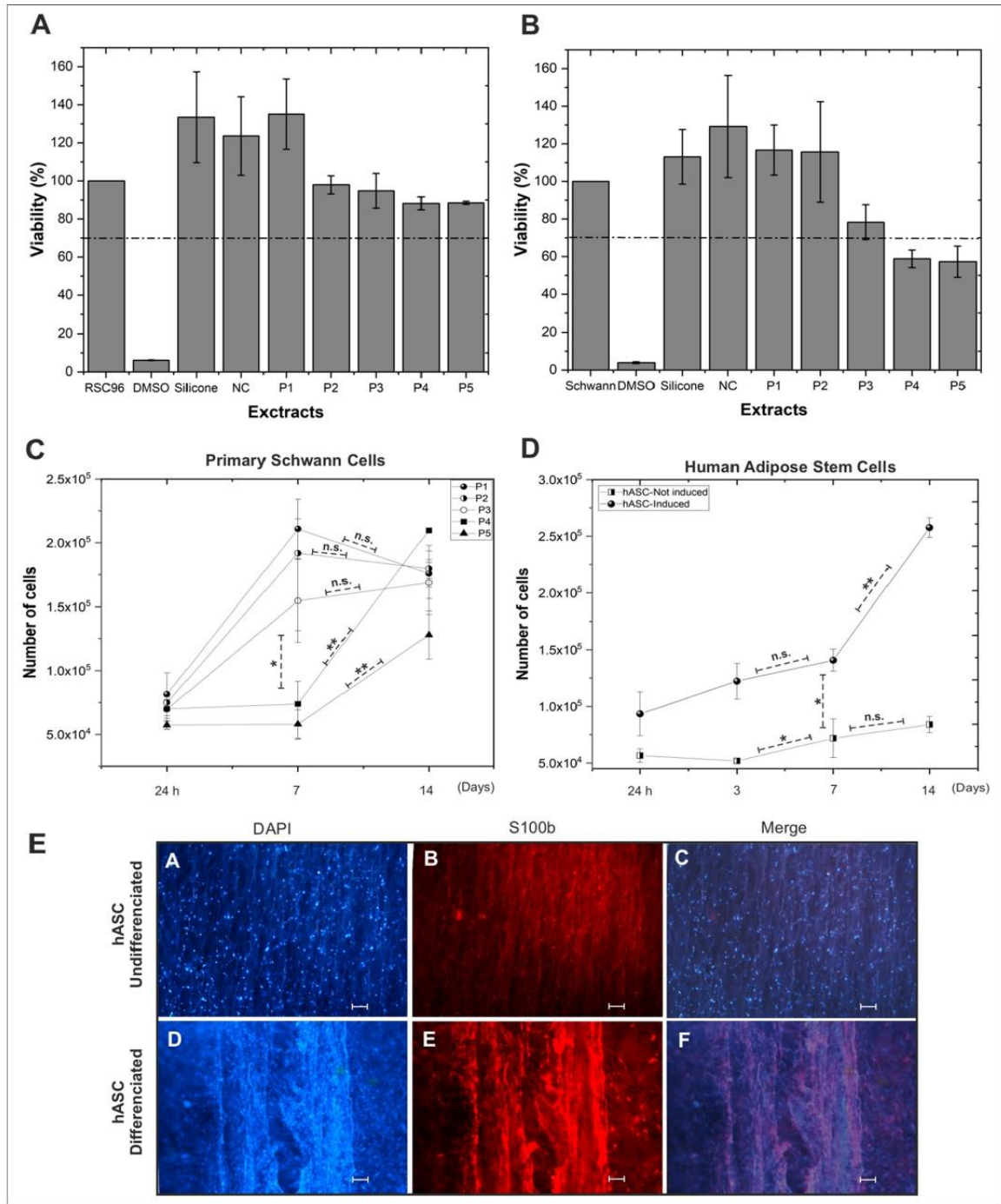


Fig. 8. Evaluation of scaffolds cytocompatibility, primary Schwann and hASC proliferation, and hASC differentiation. (A) Percentage viability of RSC96 cells. (B) Percentage viability of primary Schwann cells. (C) Primary Schwann cell proliferation in cross-linked scaffolds (P1-P5). (D) Primary hASC proliferation in the cross-linked P3 scaffold with or without Schwann induction medium. (E) Primary hASC cultured in the P3 scaffold with or without Schwann induction medium and stained with DAPI and S100b antibody. Scale bars: 100 μ m.

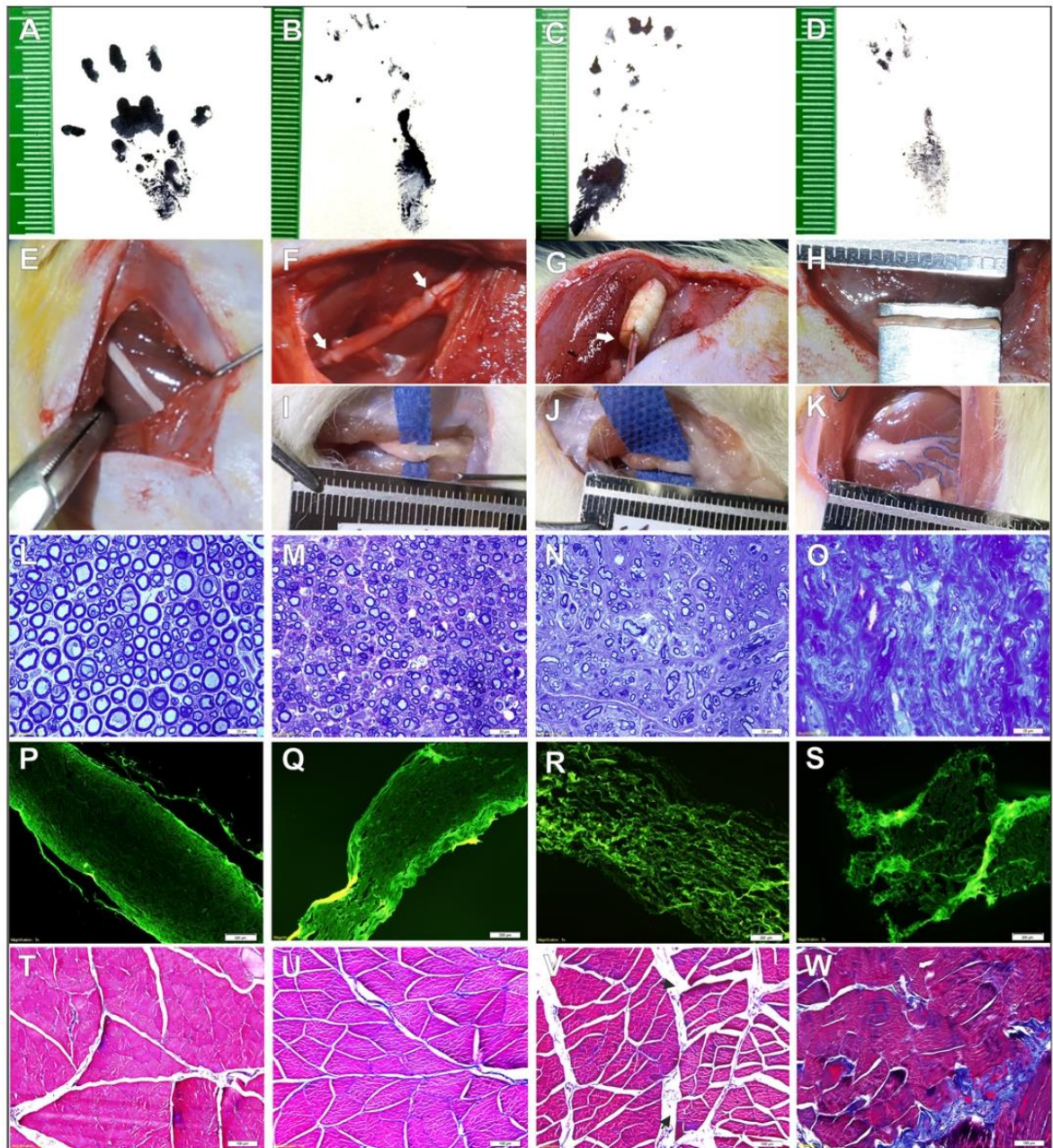


Fig. 9. Footprints, surgical and post-surgical images, and microscopic images of the repaired nerves and the gastrocnemius. Footprint of (A) Healthy, (B) Autograft implanted, (C) P3-grafted, and (D) Non-grafted animals. Surgical images of (E) Healthy sciatic, (F) Autograft implanted, (G) P3-grafted, and (H) Transected sciatic nerves. Images 12-week post-surgery of (I) Autograft, (J) P3-grafted, and (K) Non-grafted nerves. Cross-sections of (L) Healthy, (M) Autograft, (N) P3-grafted, and (O) Non-grafted nerves stained with toluidine blue. Autofluorescence images of nerve fiber fascicles from: (P) Healthy, (Q) Autograft, (R) P3-grafted, and (S) Non-grafted nerves. Histological analysis of gastrocnemius muscle from: (T) Healthy, (U) Autograft implanted, (V) P3-grafted, and (W) Non-grafted animals. White arrows on (F) points the coaptation sites. Scale Bar (L-O images: 20 μm ; P-S images: 200 μm ; T-W images: 100 μm). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

axons was higher than in the autografted nerve. Few axons, abundant connective tissue, and absence of bundles were observed in the non-grafted sectioned nerve (Fig. 9O).

Longitudinal images of nerve fiber fascicles, visualized by auto-fluorescence, showed unidirectionally oriented nerve fibers in the healthy nerve (Fig. 9P) and in the nerve that received the autograft (Fig. 9Q). In the nerve grafted with the P3 conduit, the fibers were also oriented unidirectionally, however, their density was lower than in the previous cases (Fig. 9R). In the non-grafted injured nerve, the fibers were not organized (Fig. 9S). Cross-sections of the gastrocnemius muscle stained with Masson's trichrome show the characteristic polygonal shapes of healthy muscle (Fig. 9T). These polygonal shapes are also observed in the muscle of the animals implanted with the autograft (Fig. 9U) and with the P3 conduit (Fig. 9V), however, in these groups muscle has been replaced by collagen (blue stain) and adipose tissue (septate white space). In the non-grafted group, atrophic muscle fibers with irregular appearance, fibrous connective tissue and blood vessels are observed (Fig. 9W).

The sciatic functional index (SFI) was calculated to quantitatively assess the recovery of locomotor movement (Fig. 10A). The SFI was not determined in the first two weeks because the animals could not extend their toes. The SFI values at 4 and 8 weeks were significantly lower ($p < 0.05$) for the non-grafted animals than for the autografted and P3 grafted animals, and no significant differences were observed between these last two groups ($p = 0.618$). At week 12, a partial recovery of locomotor function was observed in the two grafted groups, which was not significantly different ($p = 0.999$). Most of non-grafted animals performed autotomy on two or more fingers at week 12. For that reason, the SFI of this group was not determined after week 8.

As a result of denervation of target muscles sciatic nerve injury can lead to muscle atrophy. After weighting the wet muscles of the injured (Wi) and healthy (Wh) sides the ratio W_i/W_h was determined. The animals implanted with the autograft had a higher ratio than the animals grafted with P3, however, the difference was not significant ($p = 0.083$). In the non-grafted animals, this ratio was significantly lower than in the

animals that received the autograph ($p = 0.003$) and in the animals grafted with P3 ($p = 0.031$) (Fig. 10B).

The histomorphometric analysis showed similar axonal density in the healthy and grafted animals ($p > 0.05$). There were no significant differences between the autograft and P3 conduit grafted animals ($p = 0.999$). In the non-grafted group, this parameter was significantly lower than in the autograft ($p = 0.018$) and P3 conduit ($p = 0.020$) implanted groups. The diameter of the axons in the two grafted groups was similar ($p = 0.283$), however, autograft and P3 nerves diameters were significantly lower than those of the healthy control ($p = 0.004$ and $p = 1.2 \times 10^{-4}$, respectively). This parameter was significantly lower in non-grafted animals than in the autograft ($p = 0.006$) or P3 conduit grafted ($p = 0.001$) animals. Myelin thickness was similar in healthy, autograft ($p = 0.709$), and P3 grafted ($p = 0.059$) animals, and there were no differences between both grafted groups ($p = 0.432$). However, it was significantly lower in the non-grafted than in the healthy ($p = 5.2 \times 10^{-4}$), autograft ($p = 0.007$), and P3 grafted ($p = 0.001$) animals.

4. Discussion

The regeneration of peripheral nerve injuries continues to be a challenge for clinicians and researchers. Nerve autografts have been the gold standard treatment for large injuries [10,41]. This approach is limited by the availability of autologous nerves, because autografts are not always successful and may result in loss of sensitivity and motor function. Different conduits have been developed to guide axonal cone growth in the injured peripheral nerves that, as a result of the size of the lesion, cannot regenerate spontaneously. Although most of these conduits work in nerve defects smaller than 3.0 cm, their use in longer injuries is controversial [8,10]. For that reason, research on new devices that promote guided regeneration of peripheral nerve is still required.

Scaffolds with oriented microstructure impact morphology and behavior of the cells that grow within them [21,42]. Previous works reported on the production of cylindrical collagen nerve guides with longitudinal channels that promote directed axonal growth [24,25].

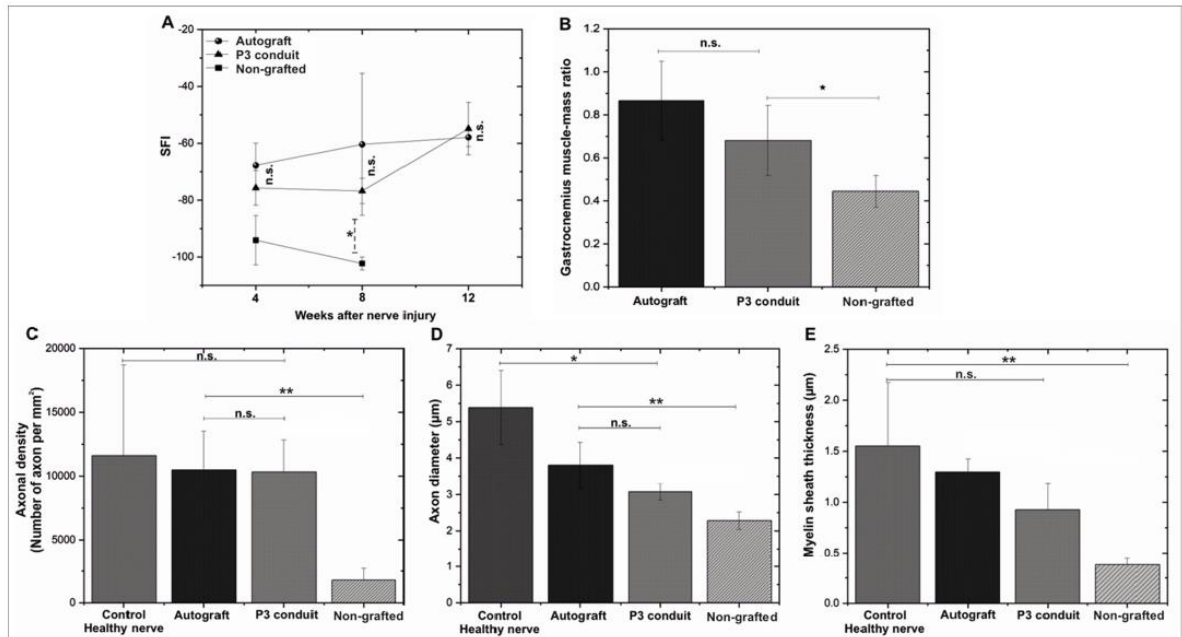


Fig. 10. Sciatic Functional Index (SFI), gastrocnemius muscle-mass ratio, and histomorphometric analysis of control, autologous grafted, P3 grafted, and non-grafted nerves. Significant differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s.: $p > 0.05$.

These guides were prepared using a patented unidirectional freezing procedure [43] in which a collagen dispersion containing elastin was cooled in a way that ice crystals grew in the form of finger-like structures - vertically from the bottom to the top of the cooling dispositive. The sponges with longitudinal channels obtained after lyophilization were punched to make cylinders with longitudinal oriented channels with fixed diameters and length.

In this work, 5 mg/g and 8 mg/g collagen type I dispersions were sequentially frozen using different methods to obtain laminar scaffolds (10 cm²) formed by a unidirectional (U) pore zone adjacent to a multidirectional (M) pore zone. The scaffolds were designed to form nerve conduits filled with an inner matrix with horizontal axial channels, which is covered by the multidirectional pore zone. These nerve conduits can be adjusted to the diameter of the stumps of a sectioned peripheral nerve. The concentration of type I collagen was higher in the M zone surrounding the conduit than in its internal U zone. This was done with the intention to hinder fibroblast migration toward the unidirectional pores/channels that guide axon migration and Schwann cell adhesion and proliferation, and also to ensure mechanical protection of the intervened nerve. This novel design allows to obtain adjustable nerve conduits with a diameter that depends on the number of folds made in the unidirectional zone of the scaffold. The freezing procedure used to prepare the U zone, promoted horizontal ice crystal nucleation (under a temperature gradient). The one used to prepare the M zone promoted random ice crystal nucleation at constant temperature (-25 °C).

Six scaffold prototypes (NC, and P1-P5), non-cross-linked or cross-linked with different concentrations of glutaraldehyde, were prepared. The pores formed in the unidirectional filler were continuous throughout the entire conduit and had low interconnectivity, suggesting that they could, *in vivo*, guide axonal growth avoiding disorganized nerve sprouts. The diameter of the inner filler channels was within the range of the diameters found for individual fascicles in human femoral and upper extremity nerves (between 200 and 1000 μm) [44,45], which suggests that the space they provide *in vivo* might allow fascicles to grow and organize spatially. Although mean pore size of the M zones of all scaffolds was significantly higher than the one of the U zone, both sizes allow cell binding and diffusion of nutrients and waste material.

Gradual degradation of NGC allows guided axonal growth, while preventing the conduits from compressing the nerve that is being repaired [46]. Hence, an evaluation of the glutaraldehyde concentration needed to obtain cross-linked scaffolds that gradually degrade while sustaining the regeneration process was carried out. Non-crosslinked control and crosslinked scaffolds with the lowest concentrations (P1 and P2) were completely degraded on day 30. In contrast, scaffolds cross-linked with 0.06, 0.08, and 0.1% v/v glutaraldehyde (P3 to P5) gradually degraded not exceeding a 60% degradation after 30 days. However, residual glutaraldehyde from P4 and P5 was cytotoxic to primary Schwann cells, and cellular proliferation in these scaffolds was lower than in NC, P1, P2 and P3 scaffolds. These and the results from the cytocompatibility assay carried out to evaluate primary Schwann adhesion, proliferation and ability to preserve phenotype upon culture on the scaffolds were considered to select scaffold P3 for the assessment of hASC growth and differentiation, and to prepare the conduits used for the animal experiment.

When grafted, the conduits are exposed to biological fluids; therefore, fluid handling capacity and hydrophilicity of the scaffolds predict their ability to allow diffusion/flux of nutrients from the interstitial fluid to the surviving nervous tissue [19]. Scaffold's liquid sorption capacity depends on its chemical composition and microstructure. This work did not find significant differences in the porosity and pore size of the unidirectional and multidirectional zones of the scaffolds. However, it found that the directionality of the pore affected the liquid sorption capacity of the scaffolds. In all cases, LSC values were higher in the M than in the U zones, which might be explained by the collagen concentration used in their manufacturing. As the M zones had more

collagen (8 mg/g) than the U zones (5 mg/g), they contained more hydrophilic polymeric fibers than the U zones and retained more water [26]. The network tortuosity of the M zones could also explain this result at the microstructural level. The multidirectional zones of the scaffolds might retain more liquid because they had more tortuous microstructure than the unidirectional zones [47,48]. Finally, the CA values - above 50° and below 90° - showed that all scaffolds had moderate hydrophilicity, which allows them to retain water and interact with cells [49].

The tensile properties of nerve conduits should be known because *in vivo* peripheral nerves are exposed to a tensile load that result in tensile stress [50]. Additionally, nerve conduits must be flexible to avoid compression of growing axons [12]. Young's modulus of the conduit made with the P3 scaffold (0.437 MPa) - chosen to evaluate the growth of Schwann cells and the differentiation of hASC to Schwann cells-like - is similar to the ones reported for decellularized sciatic nerve of rats (0.576 ± 0.16 MPa) [51]. This suggests that conduits made with P3 scaffolds might have the flexibility and resistance required to hinder axon compression *in vivo*.

It has been demonstrated that cell adhesion, affinity and shape are modulated by negatively and positively charged matrices. A previous work has shown that fibroblast adhesion and proliferation in poly (ε-caprolactone) (PCL) scaffolds, positively and negatively charged, was significantly different because fewer fibroblasts adhered to negatively charged scaffolds than to the positively charged ones [52]. The surface electric charge of conduits filled with fluids impact their biocompatibility when grafted in an injured nerve. Dorsal ganglia neurons and Schwann cells adhere and proliferate in positively charged oligo-(polyethylene glycol) fumarate (OPF) hydrogels [53]. As desired, in this work the Z potential was negative in the M zones and positive in the U zones of the P3-P5 scaffolds, suggesting the outer cover formed by the M zones of these scaffolds might not favor adherence of fibroblasts, while the inner unidirectional filling formed by the U zones might promote adhesion and proliferation of Schwann cells *in vivo*.

The cytotoxicity and ability to promote cell growth *in vitro* of the scaffolds are good predictors of their security and potential to interact with the cells they intend to guide. It was clearly shown that P3 scaffolds were non-cytotoxic for both primary Schwann cells and the neuronal Schwann cell line RSC96. In the proliferation assay, we observed that the number of primary Schwann cells on day 7 was not significantly different from the number of cells counted on day 14 for P1, P2 and P3. This result suggests that the cells entered a latency period probably induced by the change of medium that took place at that time. The number of Schwann cells in P4 and P5 increased from day 7 to day 14, probably because with the change of medium the residual glutaraldehyde that remained in these scaffolds after crosslinking was washed away.

The hASCs were used to further demonstrate the cytocompatibility of P3 because they have the potential to become Schwann-like cells and express neurotrophic factors NGF, BDNF, GDNF, and NT4 in the presence of Schwann cells [54,55]. In fact, after seeding them on the P3 scaffolds and incubating with Schwann's induction medium, they adhered and grew better than without this medium. The hASC cultured with Schwann induction medium adhered (aligned in the same direction as the unidirectional pore fibers), proliferated, and differentiated into S100b positive cells with typical spindle-shaped Schwann cell morphology. Overall, these data suggest the potential of the P3 conduit to induce mesenchymal cell differentiation to Schwann cells *in vivo*.

Taking into account data from the *in vitro* evaluation of the scaffolds (NC, P1-P5) and the tensile properties of the conduits made with them, the adjustable P3 conduit was chosen to carry out the animal study. No signs of inflammation were observed in animals implanted with the autologous nerve or with the P3 conduit. Histological analysis showed tissue with many myelinated axons in the distal portion of the grafted nerves formed in all the animals of these two groups. The diameter of the axons in the autologous and P3 implanted groups appeared smaller than the one of the healthy nerve used as control, however, the

histomorphometric analysis showed no significant differences between them. Despite there were no significant differences in the axon number and the thickness of the myelin sheath, the axons formed in P3-grafted animals appeared less symmetrical than those formed in self-grafted animals, indicating that the fibers were less mature in the first group than in the second group. Overall, animal test shows that the P3 conduit is biocompatible, integrates, and remodels when grafted into the sciatic nerve injury, promoting nerve regeneration across its width.

The gastrocnemius muscle atrophies when the sciatic nerve is injured. This results in a decrease in muscle weight and in structural changes, including the formation of fibrotic connective tissue and fat, which lead to the progressive deterioration of muscle function [55]. There were no differences in the weight of the gastrocnemius muscle between the animals grafted with the autologous nerve and those grafted with the P3 conduit. However, there were significant differences between these two groups and the non-grafted animals. Overall, these results confirm that grafting the sciatic nerve lesions evaluated in this study with the P3 conduit leads to results similar to those obtained with the autograft. Finally, the area of the laminar scaffolds that we produce is 10 cm², so the maximum length of a conduit would be 10 cm. An animal model would have to be developed to find out the potential limitations of grafting such conduits into a nerve gap of this length and to determine whether conduits of this size are functional.

5. Conclusions

In this work, two collagen type I dispersions were cross-linked with different concentrations of glutaraldehyde and frozen. Two freezing procedures were used sequentially to obtain a dispersion with a unidirectional pore/channel zone adjacent to one with multidirectional pores. Lyophilization of the differentially frozen dispersion produced six laminar scaffold prototypes with continuous unidirectional/multidirectional pore regions. These scaffolds can be rolled-up from the unidirectional to the multidirectional zone to form a conduit with a diameter that can be adjusted to the diameter of the stumps of a sectioned peripheral nerve, by controlling the folding of its unidirectional part. Taking into account the physicochemical, microstructural, and mechanical properties of the scaffolds, as well as their biodegradability, residual glutaraldehyde and cytocompatibility, the evaluation of the proliferation and differentiation of hASC was carried out only in cells grown in P3 scaffolds with Schwann induction medium. These cells adhered, aligned in the same direction as the unidirectional pore fibers, proliferated and differentiated into Schwann-like cells. The *in vivo* evaluation of P3 conduits in a rat model of transected sciatic nerve results confirmed that the P3 conduit leads to results similar to those obtained with the autograft. Overall, the results from this work highlight the biocompatibility of the P3 conduit with the grafted sciatic nerve.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111838>.

Funding

This work was funded by the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (Colciencias - now known as MinCiencias) [Grant RC 838-2015]. Mechanical characterization of scaffolds and conduits was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology/MCTES [project CICECO-Aveiro Institute of Materials, Grants UIDB/50011/2020 & UIDP/50011/2020]

Disclosure

Millán D., Jiménez R., and Fontanilla MR filed the patent application No IT2020/0005215 Superintendencia of Industry and Commerce, Ministry of Industry, Commerce, and Tourism, Colombia. Luis E. Nieto, Ivan Y. Poveda, María A. Torres, Ana S. Silva, Luis F. Ospina and João F. Mano report no conflict of interest in this work.

CRediT authorship contribution statement

Millán D.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing- Original draft preparation, Visualization. **Jiménez R.A.:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing- Original draft preparation. **Nieto L.E.:** Investigation (Surgeries). **Poveda I.Y.:** Investigation. **Torres M.A.:** Investigation. **Garzón-Silva A.S.:** Investigation - Reviewing. **Ospina L.F.:** Investigation. **Mano J.F.:** Resources, Reviewing and Editing, Funding acquisition. **Fontanilla M. R.:** Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Writing - Reviewing and Editing, Formal analysis, Project administration, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors Diana Millán, Ronal Andrés Jiménez and Marta R Fontanilla declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Millán D., Jiménez R.A., and Fontanilla M.R. filed the patent application No IT2020/0005215 Superintendencia of Industry and Commerce, Ministry of Industry, Commerce, and Tourism, Colombia.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Felipe Cabello for the critical reading of the manuscript, Dr. Julia Morales F. for providing language assistance, DVM Eliana Ortiz and DVM Diane Martinez for animal care, and Diego Lara Alonso for technical assistance.

References

- [1] R. Rebore, A. Rogers, T.L. Smith, Nerve repair with nerve conduits: problems, solutions, and future directions, *J. Hand Microsurg.* 10 (2018) 61–65, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1626687>.
- [2] D.M. Wojtkiewicz, J. Saunders, L. Domeshek, C.B. Novak, V. Kaskutas, S. E. Mackinnon, Social impact of peripheral nerve injuries, *Hand* 10 (2015) 161–167, <https://doi.org/10.1007/s11552-014-9692-0>.
- [3] M.-R.S. Rasulić L, Savić A, Vitošević F, Samardžić M4, Živković B, Mićović M, Bašćarević V, Puzović V, Joksimović B, Novaković N, Lepić M, Iatrogenic peripheral nerve injuries—surgical treatment and outcome: 10 years' experience, *World Neurosurg.* 103 (2017) 841–851. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.04.099>. Epub 2017 Apr 24.
- [4] D. Grinsell, C.P. Keating, Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 1–13, <https://doi.org/10.1155/2014/698256>.
- [5] N.F. Sachanandani, A. Pothula, T.H. Tung, Nerve gaps, *Plast. Reconstr. Surg.* 133 (2014) 313–319, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000436856.55398.0f>.
- [6] P. Tos, S. Artiac, I. Papalia, I. Marcoccio, S. Geuna, B. Battiston, Chapter 14 end-to-side nerve regeneration. From the laboratory bench to clinical applications, *Int. Rev. Neurobiol.* 87 (2009) 281–294, [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87014-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87014-1).
- [7] I.R.P. Sunderland, M.J. Brenner, J. Singham, S.R. Rickman, D.A. Hunter, S. E. Mackinnon, Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model, *Ann. Plast. Surg.* 53 (2004) 382–387, <https://doi.org/10.1097/01.sap.0000125502.63302.47>.
- [8] S. Mobini, B.S. Spearman, C.S. Lacko, C.E. Schmidt, Recent advances in strategies for peripheral nerve tissue engineering, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 4 (2017) 134–142, <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.10.010>.
- [9] J. Isaacs, S. Mallu, W. Yan, B. Little, Consequences of oversizing: nerve-to-nerve tube diameter mismatch, *J. Bone Jt. Surg. - Am. Vol.* 96 (2014) 1461–1467, <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.01420>.
- [10] F. Stang, G. Keilhoff, H. Fansa, Biocompatibility of different nerve tubes, *Materials (Basel)* 2 (2009) 1480–1507, <https://doi.org/10.3390/ma2041480>.
- [11] T. Kornfeld, P.M. Vogt, C. Radtke, Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes, *Wien. Med. Wochenschr.* 169 (2018) 240–251, <https://doi.org/10.1007/s10354-018-0675-6>.
- [12] S. Kehoe, X.F. Zhang, D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy, *Injury* 43 (2012) 553–572, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030>.
- [13] J.S. Taras, S.M. Jacoby, C.J. Lincoski, Reconstruction of digital nerves with collagen conduits, *J. Hand Surg. Am.* 36 (2011) 1441–1446, <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2011.06.009>.
- [14] M. Bąk, O. Gutłowska, E. Wagner, J. Gosk, The role of chitin and chitosan in peripheral nerve reconstruction, *Polym. Med.* 47 (2017) 43–47, <https://doi.org/10.17219/pim/75653>.

- [15] F. Neubrech, S. Heider, L. Harhaus, B. Bickert, U. Kneser, T. Kremer, Chitosan nerve tube for primary repair of traumatic sensory nerve lesions of the hand without a gap: study protocol for a randomized controlled trial, *Trials* 17 (2016) 17–48, <https://doi.org/10.1186/s13063-015-1148-5>.
- [16] K.J. Wangenstein, L.K. Kallianen, Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis, *Hand* 5 (2010) 273–277, <https://doi.org/10.1007/s11552-009-9245-0>.
- [17] R. Boni, A. Ali, A. Shavandi, A.N. Clarkson, Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering, *J. Biomed. Sci.* 25 (2018) 1–21, <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0491-8>.
- [18] J. Du, H. Chen, L. Qing, X. Yang, X. Jia, Biomimetic neural scaffolds: a crucial step towards optimal peripheral nerve regeneration, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 1299–1311, <https://doi.org/10.1039/c8bm00260f>.
- [19] V. Chiono, C. Tonda-Turo, Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering, *Prog. Neurobiol.* 131 (2015) 87–104, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.06.001>.
- [20] E.C. Spivey, Z.Z. Khaing, J.B. Shear, C.E. Schmidt, The fundamental role of subcellular topography in peripheral nerve repair therapies, *Biomaterials* 33 (2012) 4264–4276, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.043>.
- [21] Y. taek Kim, V.K. Haftel, S. Kumar, R.V. Bellamkonda, The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps, *Biomaterials* 29 (2008) 3117–3127, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.042>.
- [22] C. Sing Yian, M. Ruifa, H. Ahmet, L. Kam W, The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on schwann cell maturation, *Biomaterials* 29 (2008) 653–661, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.025>.
- [23] Y. Wang, W. Wang, Y. Wo, T. Gui, H. Zhu, X. Mo, C.C. Chen, Q. Li, W. Ding, Oriented guidance of peripheral nerve regeneration using conduits with a microtube array sheet (MTAS), *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 8437–8450, <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00215>.
- [24] A. Bozkurt, G.A. Brook, S. Moellers, F. Lassner, B. Sellhaus, J. Weis, M. Woeltje, J. Tank, C. Beckmann, P. Fuchs, L.O. Damink, F. Schügner, I. Heschel, N. Pallua, In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix, *Tissue Eng.* 13 (2007) 2971–2979, <https://doi.org/10.1089/ten.2007.0116>.
- [25] A. Bozkurt, F. Lassner, D. O'Dey, R. Deumens, A. Böcker, T. Schwendt, C. Janzen, C.V. Suschek, R. Tolba, E. Kobayashi, B. Sellhaus, S. Tholl, L. Eummelen, F. Schügner, L. Olde Damink, J. Weis, G.A. Brook, N. Pallua, The role of microstructured and interconnected pore channels in a collagen-based nerve guide on axonal regeneration in peripheral nerves, *Biomaterials* 33 (2012) 1363–1375, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.069>.
- [26] E. Suesca, A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, H.C. de Sousa, M.R. Fontanilla, Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* 77 (2017) 333–341, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.243>.
- [27] S.T. Ho, D.W. Hutmacher, A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 1362–1376, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.08.035>.
- [28] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (2005) 5474–5491, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.
- [29] B. Starcher, A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples, *Anal. Biochem.* 292 (2001) 125–129, <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5050>.
- [30] F. Nault, P. De Koninck, Dissociated hippocampal cultures: protocols for neural cell culture, in: L.C. Doering (Ed.), *Protoc. Neural Cell Cult.* Springer Protoc. Handbooks, 4th ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2010, pp. 137–159, <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-292-6>.
- [31] N.D. Andersen, S. Srinivas, G. Piñero, P.V. Monje, A rapid and versatile method for the isolation, purification and cryogenic storage of Schwann cells from adult rodent nerves, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–17, <https://doi.org/10.1038/srep31781>.
- [32] M. Georgiou, J.P. Golding, A.J. Loughlin, P.J. Kingham, J.B. Phillips, Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve, *Biomaterials* 37 (2015) 242–251, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.009>.
- [33] M. Araña, M. Mazo, P. Aranda, B. Pelacho, F. Prosper, Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization, *Methods Mol. Biol.* 1036 (2013) 47–61, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-511-8_4.
- [34] ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices - Part 5: in vitro cytotoxicity tests, 3rd Edition, 2009, 2009-06-01, <https://www.iso.org/standard/36406.html>. (Accessed 6 June 2020).
- [35] C. Kilkenny, W.J. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, D.G. Altman, Improving bioscience research reporting: the arrive guidelines for reporting animal research, *Animals* 4 (2013) 35–44, <https://doi.org/10.3390/ani4010035>.
- [36] D.B. Morton, P.H. Griffiths, Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment, *Vet. Rec.* 116 (1985) 431–436, <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>.
- [37] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011, <https://doi.org/10.17226/12910>.
- [38] L. Costa, M. Simoes, A. Mauricio, A. Varejao, International review of neurobiology, in: Elsevier (Ed.), *Essays on Peripheral Nerve Repair and Regeneration*, Int. Rev. Neurobiol., 2009, pp. 127–136.
- [39] F. Ma, Z. Xiao, D. Meng, X. Hou, J. Zhu, J. Dai, R. Xu, Use of natural neural scaffolds consisting of engineered vascular endothelial growth factor immobilized on ordered collagen fibers filled in a collagen tube for peripheral nerve regeneration in rats, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 18593–18609, <https://doi.org/10.3390/ijms151018593>.
- [40] S.G.A. van Neerven, K. Haastert-Talini, A. Boecker, T. Schriever, C. Dabhi, K. Claeys, R. Deumens, G.A. Brook, J. Weis, N. Pallua, A. Bozkurt, Two-component collagen nerve guides support axonal regeneration in the rat peripheral nerve injury model, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2017) 3349–3361, <https://doi.org/10.1002/term.2248>.
- [41] S. Mobini, B.S. Spearman, C.S. Lacko, C.E. Schmidt, Recent advances in strategies for peripheral nerve tissue engineering, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 4 (2017) 134–142, <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.10.010>.
- [42] S.Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, K.W. Leong, The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation, *Biomaterials* 29 (2008) 653–661, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.025>.
- [43] U.S. Patent, Method for producing porous structures, US 6,447,701 B1, 2008. <https://patentimages.storage.googleapis.com/13/7e/28/2eaffa567acc26/US6447701.pdf>.
- [44] K.J. Gustafson, G.C.J. Pinault, J.J. Neville, I. Syed, J.A. Davis, J. Jean-Claude, R. J. Triolo, Fascicular anatomy of human femoral nerve: implications for neural prostheses using nerve cuff electrodes, *J. Rehabil. Res. Dev.* 46 (2009) 973–984, <https://doi.org/10.1682/JRRD.2008.08.0097>.
- [45] N.A. Brill, D.J. Tyler, Quantification of human upper extremity nerves and fascicular anatomy, *Muscle Nerve* 56 (2017) 463–471, <https://doi.org/10.1002/mus.25534>.
- [46] W. Daly, L. Yao, D. Zeugolis, A. Windebank, A. Pandit, A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery, *J. R. Soc. Interface* 9 (2012) 202–221, <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0438>.
- [47] F. Ganji, S. Vashghani-Farahani, E. Vashghani-Farahani, Theoretical description of hydrogel swelling: a review, *Iran. Polym. J. (English Ed.)* 19 (2010) 375–398.
- [48] H.-I. Chang, Y. Wang, Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds, in: *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater.*, 2011, pp. 569–588, <https://doi.org/10.5772/21983>.
- [49] P.O. Forest, R. Karoum, C.H. Gagnieu, Influence of gradual introduction of hydrophobic groups (stearic acid) in denatured atelocollagen on fibroblasts behavior in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 80 (2007) 758–767, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31042>.
- [50] K.S. Topp, B.S. Boyd, Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice, *Phys. Ther.* 86 (2006) 92–109, <https://doi.org/10.1093/ptj/86.1.92>.
- [51] G.H. Borschel, K.F. Kia, W.M. Kuzon, R.G. Dennis, Mechanical properties of acellular peripheral nerve, *J. Surg. Res.* 114 (2003) 133–139, [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00255-5](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00255-5).
- [52] J. Kim, D.H. Kim, K.T. Lim, H. Seonwoo, S.H. Park, Y.R. Kim, Y. Kim, Y.H. Choung, P.H. Choung, J.H. Chung, Charged nanomaterials as efficient platforms for modulating cell adhesion and shape, *Tissue Eng. - Part C Methods* 18 (2012) 913–923, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0731>.
- [53] M. Dadsetan, A.M. Knight, L. Lu, A.J. Windebank, M.J. Yaszemski, Stimulation of neurite outgrowth using positively charged hydrogels, *Biomaterials* 30 (2009) 3874–3881, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.018>.
- [54] A.J. Reid, M. Sun, M. Wiberger, S. Downes, G. Terenghi, P.J. Kingham, Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis, *Neuroscience* 199 (2011) 515–522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.064>.
- [55] C.R. Carvalho, J.M. Oliveira, R.L. Reis, Modern trends for peripheral nerve repair and regeneration: beyond the hollow nerve guidance conduit, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019), <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00337>.

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Ref. Solicitud N° IT2020/0005215

LA SECRETARIA GENERAL AD-HOC

En atención a la solicitud de JAIME FRANKY RODRÍGUEZ No. IT2020/0005215 del 18 de junio de 2020,

CERTIFICA:

Que consultados los archivos de la oficina, se encontró bajo el número de expediente NC2020/0007445 una solicitud de Patente de Invención con las siguientes características:

FECHA DE SOLICITUD: 18 de junio de 2020
TITULO: CONDUCTOS NERVIOSOS PLEGABLES BIFÁSICOS DE COLÁGENO TIPO I CON POROS UNIDIRECCIONALES Y MULTIDIRECCIONALES Y SU MÉTODO DE ELABORACIÓN
SOLICITANTE: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
INVENTOR: MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE, RONALD ANDRES JIMENEZ CRUZ, Diana Milena Millan Cortes
ESTADO: Bajo Verificación de Requisitos Mínimos

La presente certificación se expide en Bogotá, D.C., el día 25 de junio de 2020, y no representa responsabilidad alguna para la Superintendencia de Industria y Comercio sobre la eficiencia, efectividad o posibilidad de reproducción en relación con los aspectos técnicos referidos en los documentos señalados.



SECRETARIA AD-HOC

Página 1 de 1






termis
 AMERICAS
 TISSUE ENGINEERING AND
 REGENERATIVE MEDICINE
 INTERNATIONAL SOCIETY
 1st TERMIS-AM WORKSHOP

CERTIFICATE

We certify that the **DEVELOPMENT OF BIPHASIC SCAFFOLDS OF COLLAGEN TYPE I FOR PERIPHERAL NERVE REGENERATION** work, written by DIANA MILLAN, RONALD ANDRES JIMENEZ, SOFIA SILVA, JOAO MANO, MARTA RAQUEL FONTANILLA, was exhibited at the 1st TERMIS AM Workshop held in Porto Alegre Rio Grande do Sul, Brazil, from June 29th to July 1st, 2018.


 Prof. Patricia Pramke, PhD
 Full Professor - UFRRS
 President of the Council - Stem Cell Research Institute
 Member of the Council - TERMS-AM


 Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva
 Coordinator of 3d Technologies Research Group
 CTI Renato Archer

Organizers:





6th World Congress 2021
Tissue Engineering and
Regenerative Medicine
International Society (TERMIS2021)

Biologically inspired technology driven regenerative medicine

Certificate of Attendance

We hereby declare that

DIANA MILLAN
Universidad Nacional de Colombia

has participated in the 6th World Congress TERMIS
November 15 – November 19, 2021

Stichting TERMIS 2021 Conference *official and legal organizer of*
6th World Congress TERMIS



Prof. dr.
Lorenzo Moroni
Chair



Prof. dr.
Liesbet Geris
Co-Chair



Prof. dr.
Stefan
Jockenhövel
Co-Chair

**TERMIS 6th World
Congress**
**November 15 – November
19, 2021**
Maastricht
The Netherlands

Congress chairs:

Lorenzo Moroni, chair
Maastricht University

Liesbeth Geris, co-chair
University of Liege, KU
Leuven

Stefan Jockenhövel, co-
chair
RWTH Aachen, Maastricht
University

Congress Secretariat:

Stichting TERMIS 2021
Conference
Universiteitssingel 40
6229 ER MAASTRICHT
The Netherlands

Chamber of Commerce:
73320714

E.
helpdesk@klinkhamergroup.com
T. +31 (0)43 3881845

11. Referencias

1. Rebowe R, Rogers A, Yang X, Kundu S, Smith T, Li Z. Nerve Repair with Nerve Conduits: Problems, Solutions, and Future Directions. *J Hand Microsurg*. 2018;10(02):61–5.
2. Wojtkiewicz DM, Saunders J, Domeshek L, Novak CB, Kaskutas V, Mackinnon SE. Social Impact of Peripheral Nerve Injuries. *HAND* [Internet]. 2015 Jun 25;10(2):161–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1007/s11552-014-9692-0>
3. Rasulić L, Savić A, Vitošević F, Samardžić M, Živković B, Mićović M, et al. Iatrogenic Peripheral Nerve Injuries—Surgical Treatment and Outcome: 10 Years' Experience. *World Neurosurg* [Internet]. 2017 Jul;103:841–851.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878875017306071>
4. Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/698256/>
5. Sachanandani NF, Pothula A, Tung TH. Nerve gaps. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(2):313–9.
6. Tos P, Artiaco S, Papalia I, Marcoccio I, Geuna S, Battiston B. Chapter 14 End-to-Side Nerve Regeneration. In 2009. p. 281–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074774209870141>
7. Sunderland IRP, Brenner MJ, Singham J, Rickman SR, Hunter DA, Mackinnon SE. Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model. *Ann Plast Surg*. 2004;53(4):382–7.
8. Mobini S, Spearman BS, Lacko CS, Schmidt CE. Recent advances in strategies for peripheral nerve tissue engineering. *Curr Opin Biomed Eng*. 2017;4:134–42.
9. Isaacs J, Mallu S, Yan W, Little B. Consequences of oversizing: Nerve-to-nerve tube diameter mismatch. *J Bone Jt Surg - Am Vol*. 2014;96(17):1461–7.
10. Stang F, Keilhoff G, Fansa H. Biocompatibility of different nerve tubes. Vol. 2, *Materials*. 2009. p. 1480–507.
11. Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, Hasirci N, Hasirci V. Peripheral nerve conduits: Technology update. Vol. 7, *Medical Devices: Evidence and Research*. 2014. p. 405–24.
12. Moore AM, Macewan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: A comparative study. *Muscle Nerve* [Internet]. 2011 Aug;44(2):221–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mus.22033>
13. Kornfeld T, Vogt PM, Radtke C. Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2018;169(9):240–251.
14. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. Vol. 43, *Injury*. 2012. p. 553–72.
15. Taras JS, Jacoby SM, Lincoski CJ. Reconstruction of digital nerves with collagen conduits. *J Hand Surg Am*. 2011;36(9):1441–6.
16. Bąk M, Gutlowska O, Wagner E, Gosk J. The role of chitin and chitosan in peripheral

- nerve reconstruction. *Polym Med*. 2017;47(1):43–7.
17. Wangenstein KJ, Kalliainen LK. Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: A retrospective analysis. *Hand*. 2010;5(3):273–7.
 18. Boni R, Ali A, Shavandi A, Clarkson AN. Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):1–21.
 19. Du J, Chen H, Qing L, Yang X, Jia X. Biomimetic neural scaffolds: A crucial step towards optimal peripheral nerve regeneration. Vol. 6, *Biomaterials Science*. 2018. p. 1299–311.
 20. Chiono V, Tonda-Turo C. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. Vol. 131, *Progress in Neurobiology*. 2015. p. 87–104.
 21. Kim Y tae, Haftel VK, Kumar S, Bellamkonda R V. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials*. 2008;29(21):3117–27.
 22. Spivey EC, Khaing ZZ, Shear JB, Schmidt CE. The fundamental role of subcellular topography in peripheral nerve repair therapies. Vol. 33, *Biomaterials*. 2012. p. 4264–76.
 23. Chew SY, Mi R, Hoke A, Leong KW. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. *Biomaterials*. 2008;29(6):653–61.
 24. Wang Y, Wang W, Wo Y, Gui T, Zhu H, Mo X, et al. Orientated guidance of peripheral nerve regeneration using conduits with a microtube array sheet (MTAS). *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(16):8437–50.
 25. Bozkurt A, Brook GA, Moellers S, Lassner F, Sellhaus B, Weis J, et al. In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix. *Tissue Eng*. 2007;13(12):2971–9.
 26. Bozkurt A, Lassner F, O'Dey D, Deumens R, Böcker A, Schwendt T, et al. The role of microstructured and interconnected pore channels in a collagen-based nerve guide on axonal regeneration in peripheral nerves. *Biomaterials*. 2012;33(5):1363–75.
 27. Suesca E, Dias AMA, Braga MEM, de Sousa HC, Fontanilla MR. Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Mater Sci Eng C*. 2017;77:333–41.
 28. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Tejido excitable: nervios. In: *Fisiología médica*. 27th ed. 2016. p. 85–97.
 29. Schmidt CE, Leach JB. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu Rev Biomed Eng*. 2003;5(1):293–347.
 30. Verkhatsky A, Ho MS, Zorec R, Parpura V. The Concept of Neuroglia. In 2019. p. 1–13. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9913-8_1
 31. Raasakka A, Kursula P. Flexible Players within the Sheaths: The Intrinsically Disordered Proteins of Myelin in Health and Disease. *Cells* [Internet]. 2020 Feb 18;9(2):470. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/470>
 32. Cermenati G, Mitro N, Audano M, Melcangi RC, Crestani M, De Fabiani E, et al. Lipids in the nervous system: From biochemistry and molecular biology to pathophysiology. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2015 Jan;1851(1):51–60. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198114001668>
33. Poitelon Y, Kopec AM, Belin S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 27;9(4):812. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/812>
 34. Reina MA, Sala-Blanch X, Arriazu R, Machés F. Microscopic Morphology and Ultrastructure of Human Peripheral Nerves. In: *Nerves and Nerve Injuries* [Internet]. Elsevier; 2015. p. 91–106. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012410390000007X>
 35. Kaemmer D, Bozkurt A, Otto J, Junge K, Klink C, Weis J, et al. Evaluation of tissue components in the peripheral nervous system using Sirius red staining and immunohistochemistry: A comparative study (human, pig, rat). *J Neurosci Methods*. 2010;190(1):112–6.
 36. Pavelka M, Roth J. Peripheral Nerve: Connective Tissue Components. In: *Functional Ultrastructure* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2010. p. 324–5. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-99390-3_166
 37. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. Vol. 82, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. p. 160–7.
 38. Hart AM, Terenghi G, Wiberg M. Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. *Neurol Res* [Internet]. 2008 Dec 19;30(10):999–1011. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/174313208X362479>
 39. Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* [Internet]. 1943;66(4):237–88. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/66.4.237>
 40. Ryu J, Beimesch CF, Lalli TJ. (iii) Peripheral nerve repair. *Orthop Trauma*. 2011;25(3):174–80.
 41. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MAE, Joosten EAJ, Weis J, et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2010 Nov;92(3):245–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008210001723>
 42. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* [Internet]. 1951;74(4):491–516. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/74.4.491>
 43. Wolfla CE, Resnick DK, editors. 68 Surgical Techniques for Peripheral Nerve Repair. In: *Spine and Peripheral Nerves* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/abstract/10.1055/b-0034-84037>
 44. Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. Vol. 100, *Acta neurochirurgica Supplement*. 2007. p. 37–8.
 45. Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, et al. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2020;16(1):116–34. Available from: <http://www.ijbs.com/v16p0116.htm>
 46. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving

- neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2000;25(3):391–414.
47. Philips C, Cornelissen M, Carriel V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *J Neural Eng* [Internet]. 2018 Apr 1;15(2):021003. Available from: <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aaa21a>
 48. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng* [Internet]. 2004 Nov;10(9–10):1346–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588395>
 49. Brooks DN, Weber R V., Chao JD, Rinker BD, Zoldos J, Robichaux MR, et al. Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: A multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery* [Internet]. 2012 Jan;32(1):1–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/micr.20975>
 50. Means KR, Rinker BD, Higgins JP, Payne SH, Merrell GA, Wilgis EFS. A Multicenter, Prospective, Randomized, Pilot Study of Outcomes for Digital Nerve Repair in the Hand Using Hollow Conduit Compared With Processed Allograft Nerve. *HAND* [Internet]. 2016 Jun 17;11(2):144–51. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1558944715627233>
 51. Muheremu A, Ao Q. Past, Present, and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/237507/>
 52. Konofaos P, Ver Halen J. Nerve Repair by Means of Tubulization: Past, Present, Future. *J Reconstr Microsurg* [Internet]. 2013 Jan 9;29(03):149–64. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0032-1333316>
 53. Yang Y, Yuan X, Ding F, Yao D, Gu Y, Liu J, et al. Repair of Rat Sciatic Nerve Gap by a Silk Fibroin-Based Scaffold Added with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng - Part A*. 2011;17(17–18):2231–44.
 54. Tang X, Xue C, Wang Y, Ding F, Yang Y, Gu X. Bridging peripheral nerve defects with a tissue engineered nerve graft composed of an in vitro cultured nerve equivalent and a silk fibroin-based scaffold. *Biomaterials* [Internet]. 2012 May;33(15):3860–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212001731>
 55. Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G. Addition of Fibronectin to Alginate Matrix Improves Peripheral Nerve Regeneration in Tissue-Engineered Conduits. *Tissue Eng* [Internet]. 2003 Apr;9(2):209–18. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107632703764664684>
 56. Ding F, Wu J, Yang Y, Hu W, Zhu Q, Tang X, et al. Use of Tissue-Engineered Nerve Grafts Consisting of a Chitosan/Poly(lactic- co -glycolic acid)-Based Scaffold Included with Bone Marrow Mesenchymal Cells for Bridging 50-mm Dog Sciatic Nerve Gaps. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2010 Dec;16(12):3779–90. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2010.0299>
 57. Frattini F, Pereira Lopes FR, Almeida FM, Rodrigues RF, Boldrini LC, Tomaz MA, et al. Mesenchymal Stem Cells in a Polycaprolactone Conduit Promote Sciatic Nerve Regeneration and Sensory Neuron Survival after Nerve Injury. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2012 Oct;18(19–20):2030–9. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2011.0496>

58. Kornfeld T, Vogt PM, Radtke C. Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes. *Wiener Medizinische Wochenschrift* [Internet]. 2019 Jun 13;169(9–10):240–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10354-018-0675-6>
59. Lavorato A, Raimondo S, Boido M, Muratori L, Durante G, Cofano F, et al. Mesenchymal Stem Cell Treatment Perspectives in Peripheral Nerve Regeneration: Systematic Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan 8;22(2):572. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/572>
60. Kim HA, Maurel P. Primary Schwann Cell Cultures. In: Doering LC, editor. *Protocols for Neural Cell Culture*, Springer Protocols Handbooks. 4th ed. 2009. p. 253–68.
61. Schuh CMAP, Sandoval-Castellanos AM, De Gregorio C, Contreras-Kallens P, Haycock JW. The Role of Schwann Cells in Peripheral Nerve Function, Injury, and Repair. In: *Cell Engineering and Regeneration* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-37076-7_5-1
62. Yi S ZY, Gu X HL, K Z, Qian T GX. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration. *Burn Trauma* [Internet]. 2020;27(8). Available from: http://fdslive.oup.com/www.oup.com/pdf/production_in_progress.pdf
63. Jiang L, Jones S, Jia X. Stem Cell Transplantation for Peripheral Nerve Regeneration: Current Options and Opportunities. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Jan 5;18(1):94. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/94>
64. Gu Y, Li Z, Huang J, Wang H, Gu X, Gu J. Application of marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix in peripheral nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2017 Aug;11(8):2250–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.2123>
65. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Jan 1;3(1):a004978–a004978. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a004978>
66. Lin K, Zhang D, Macedo MH, Cui W, Sarmiento B, Shen G. Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Adv Funct Mater* [Internet]. 2019 Jan;29(3):1804943. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.201804943>
67. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: Properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* [Internet]. 2003 Mar 1;88(4):660–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.10413>
68. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(24):6143–56.
69. Fornasari BE, Carta G, Gambarotta G, Raimondo S. Natural-Based Biomaterials for Peripheral Nerve Injury Repair. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Oct 16;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.554257/full>
70. Kim Y, Haftel VK, Kumar S, Bellamkonda R V. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* [Internet]. 2008 Jul;29(21):3117–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002263>
71. Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater* [Internet]. 2020

- Apr;106:54–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706120300817>
72. <https://www.integralife.com/neurawrap-nerve-protector/product/nerve-tendon-neurawrap-nerve-protector>.
 73. Bustos RH, Suesca E, Millán D, González JM, Fontanilla MR. Real-Time Quantification of Proteins Secreted by Artificial Connective Tissue Made from Uni-Or Multidirectional Collagen I Scaffolds and Oral Mucosa Fibroblasts. *Anal Chem* [Internet]. 2014 Mar 4;86(5):2421–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac4033164>
 74. Fontanilla MR, Suesca E, Jiménez RA. Procedimiento para la preparación de colágeno tipo 1 y de soportes unidireccionales y multidireccionales que lo contienen. [Internet]. Colombia; WO/2016/071876, 2016. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2016071876A1/es?q=WO%2F2016%2F071876>
 75. Suesca E. Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial. 2013.
 76. Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2009;395(3):829–37.
 77. De Campos Vidal B, Mello MLS. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*. 2011;42(3):283–9.
 78. Reddy N, Reddy R, Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. Vol. 33, *Trends in Biotechnology*. 2015. p. 362–9.
 79. Zhu S-ML. European Patent Office. Method and apparatus for rapidly assaying aldehyde-containing disinfectant [Internet]. EP1256799A2, 2002. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/49/90/7d/1097d57b3e735c/EP1256799A2.pdf>
 80. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [Internet]. 2008 Jul;29(20):2941–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002676>
 81. Ferrari M, Cirisano F, Morán MC. Mammalian Cell Behavior on Hydrophobic Substrates: Influence of Surface Properties. *Colloids and Interfaces*. 2019;3(2):48.
 82. Grundke K, Pöschel K, Synytska A, Frenzel R, Drechsler A, Nitschke M, et al. Experimental studies of contact angle hysteresis phenomena on polymer surfaces — Toward the understanding and control of wettability for different applications. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2015 Aug;222:350–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868614002905>
 83. Metwally S, Stachewicz U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019 Nov;104:109883. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493119304576>
 84. Andersen ND, Srinivas S, Piñero G, Monje P V. A rapid and versatile method for the isolation, purification and cryogenic storage of Schwann cells from adult rodent nerves. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 23;6(1):31781. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep31781>
 85. Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose tissue-derived

- mesenchymal stem cells: Isolation, expansion, and characterization. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2013. p. 47–61. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-511-8_4
86. ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices - Part 5: in vitro cytotoxicity tests. 3rd Edition. [Internet]. 2009 [cited 2020 Jun 6]. Available from: <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
 87. Georgiou M, Golding JP, Loughlin AJ, Kingham PJ, Phillips JB. Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *Biomaterials* [Internet]. 2015 Jan;37:242–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214010564>
 88. Sun X, Zhu Y, Yin HY, Guo ZY, Xu F, Xiao B, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell-like cells through intermittent induction: Potential advantage of cellular transient memory function. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 Dec 11;9(1):133. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-018-0884-3>
 89. Kilkenny C, Browne W, Cuthill I, Emerson M, Altman D. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *Animals* [Internet]. 2014 Feb 3;4(1):35–44. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-2615/4/1/35>
 90. Morton D, Griffiths P. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* [Internet]. 1985 Apr 20;116(16):431–6. Available from: <https://veterinaryrecord.bmj.com/lookup/doi/10.1136/vr.116.16.431>
 91. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011. Available from: <https://doi.org/10.17226/12910>.
 92. Costa L, Simoes M, Mauricio A, Varejao A. International Review of Neurobiology. *Essays on Peripheral Nerve Repair and Regeneration*. In: Elsevier, editor. *International Review of Neurobiology*. 2009. p. 127–36.
 93. Ma F, Xiao Z, Meng D, Hou X, Zhu J, Dai J, et al. Use of natural neural scaffolds consisting of engineered vascular endothelial growth factor immobilized on ordered collagen fibers filled in a collagen tube for peripheral nerve regeneration in rats. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):18593–609.
 94. van Neerven SGA, Haastert-Talini K, Boecker A, Schriever T, Dabhi C, Claeys K, et al. Two-component collagen nerve guides support axonal regeneration in the rat peripheral nerve injury model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(12):3349–61.
 95. AVMA. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. 2001 Mar;218(5):669–96. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2001.218.669>
 96. Nair M, Best SM, Cameron RE. Crosslinking Collagen Constructs: Achieving Cellular Selectivity Through Modifications of Physical and Chemical Properties. *Appl Sci* [Internet]. 2020 Oct 2;10(19):6911. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/19/6911>
 97. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, et al.

- Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324906708817>
98. Carvalho CR, Oliveira JM, Reis RL. Modern Trends for Peripheral Nerve Repair and Regeneration: Beyond the Hollow Nerve Guidance Conduit. Vol. 7, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019.
 99. Patent US. Method for producing porous structures [Internet]. United States; US 6,447,701 B1, 2008. p. 1–12. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/13/7e/28/2eaffa567acc26/US6447701.pdf>
 100. <https://www.integralife.com/neurawrap-nerve-protector/product/nerve-tendon-neurawrap-nerve-protector> sitio consultado el 22/02/2020.
 101. Song S, Wang X, Wang T, Yu Q, Hou Z, Zhu Z, et al. Additive Manufacturing of Nerve Guidance Conduits for Regeneration of Injured Peripheral Nerves. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Sep 25;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.590596/full>
 102. Pawelec KM, Koffler J, Shahriari D, Galvan A, Tuszynski MH, Sakamoto J. Microstructure and in vivo characterization of multi-channel nerve guidance scaffolds. *Biomed Mater* [Internet]. 2018 Apr 25;13(4):044104. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/aaad85>
 103. Gustafson KJ, Pinault GCJ, Neville JJ, Syed I, Davis JA, Jean-Claude J, et al. Fascicular anatomy of human femoral nerve: Implications for neural prostheses using nerve cuff electrodes. *J Rehabil Res Dev*. 2009;46(7):973–84.
 104. Brill NA, Tyler DJ. Quantification of human upper extremity nerves and fascicular anatomy. *Muscle and Nerve*. 2017;56(3):463–71.
 105. Huang L, Zhu L, Shi X, Xia B, Liu Z, Zhu S, et al. A compound scaffold with uniform longitudinally oriented guidance cues and a porous sheath promotes peripheral nerve regeneration in vivo. *Acta Biomater* [Internet]. 2018 Mar;68:223–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706117307663>
 106. Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: Bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. Vol. 9, *Journal of the Royal Society Interface*. 2012. p. 202–21.
 107. Salvatore L, Madaghiele M, Parisi C, Gatti F, Sannino A. Crosslinking of micropatterned collagen-based nerve guides to modulate the expected half-life. *J Biomed Mater Res Part A* [Internet]. 2014 Feb;n/a-n/a. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.35124>
 108. Ganji F, Vasheghani-Farahani S, Vasheghani-Farahani E. Theoretical description of hydrogel swelling: A review. *Iran Polym J (English Ed)*. 2010;19(5):375–98.
 109. Chang H-I, Wang Y. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. 2011. p. 569–88.
 110. Forest PO, Karoum R, Gagnieu CH. Influence of gradual introduction of hydrophobic groups (stearic acid) in denatured atelocollagen on fibroblasts behavior in vitro. Vol. 80, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2007. p. 758–67.

111. Topp KS, Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: Nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. Vol. 86, Physical Therapy. 2006. p. 92–109.
112. Borschel GH, Kia KF, Kuzon WM, Dennis RG. Mechanical properties of acellular peripheral nerve. J Surg Res. 2003;114(2):133–9.
113. Dadsetan M, Knight AM, Lu L, Windebank AJ, Yaszemski MJ. Stimulation of neurite outgrowth using positively charged hydrogels. Biomaterials. 2009;30(23–24):3874–81.
114. Kim J, Kim DH, Lim KT, Seonwoo H, Park SH, Kim YR, et al. Charged nanomaterials as efficient platforms for modulating cell adhesion and shape. Tissue Eng - Part C Methods. 2012;18(12):913–23.
115. Reid AJ, Sun M, Wiberg M, Downes S, Terenghi G, Kingham PJ. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. Neuroscience. 2011;199:515–22.