

CONDUCTOS NERVIOSOS PLEGABLES BIFÁSICOS DE COLÁGENO TIPO I CON POROS UNIDIRECCIONALES Y MULTIDIRECCIONALES Y SU MÉTODO DE ELABORACIÓN

SECTOR TECNOLÓGICO

Esta invención pertenece al campo de dispositivos médicos del sector de la salud. Describe el método para producir un soporte poroso de colágeno tipo I constituido por dos zonas continuas: una con poros orientados unidireccionalmente y otra con poros orientados multidireccionalmente. Cuando el soporte se humedece y se plega de la zona unidireccional hacia la multidireccional, forma un conducto que sirve para conectar los muñones de nervios periféricos seccionados ajustándose a su diámetro; este conducto, se puede inyectar en nervios periféricos lesionados con el fin de que guíe su regeneración.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las lesiones de nervio periférico generalmente se asocian a traumas mecánicos directos. Por las limitaciones funcionales que producen impactan la calidad de vida del paciente y el costo del sistema de salud. Este tipo de lesiones ocasionan cerca de 8.5 millones de incapacidades laborales y al menos 5 millones de personas postradas en cama cada año [1]. Las estrategias terapéuticas actuales buscan la sobrevivencia neuronal, la regeneración axonal y la inervación nerviosa; sin embargo, aún no se cuenta con una opción terapéutica completamente efectiva debido a la complejidad de los eventos celulares y moleculares que ocurren inmediatamente después del daño del nervio periférico. La reparación quirúrgica del nervio periférico tiene efectos parcialmente neuroprotectores y sus resultados dependen de que la intervención se lleve a cabo en las primeras 24 horas posteriores a la lesión [2]. Sin embargo, debido a que no constituye una urgencia vital, en la mayoría de los casos no es posible que esto ocurra; por eso, se deben explorar alternativas que aseguren la neuroprotección de los tejidos lesionados.

Anualmente, las lesiones del nervio periférico afectan a más de un millón de personas en todo el mundo [3]. Producen limitaciones funcionales y dolor neuropático que impactan la calidad de vida de los pacientes y los costos del sistema de salud [4–6]. La transección completa del axón y el tejido conectivo (neurotmesis) y la lesión que mantiene la continuidad del nervio pero degenera al axón y su vaina de mielina (axonotmesis grave) se tratan quirúrgicamente [4,7]. Usualmente, el muñón distal (receptor) es suturado con el muñón proximal (donante) del nervio seccionado (neurorrafia de extremo extremo) o se coapta al tronco de un nervio donante adyacente (neurorrafia de extremo a lado). Cuando la distancia entre los muñones o entre el muñón distal y el tronco del nervio adyacente es grande, no se pueden hacer suturas libres de tensiones. En estos casos los muñones se conectan con autoinjertos de nervio periférico. Las mayores limitaciones del autoinjerto son la disponibilidad de nervio donante, la diferencia que se puede presentar entre el diámetro del injerto y el de los muñones que se van a conectar y el tamaño de la lesión. Este último parámetro es muy importante ya que las probabilidades de éxito de los autoinjertos disminuyen cuando aumenta el tamaño de la lesión; en humanos, constituyen el tratamiento de elección en lesiones menores de 30 mm [1].

Una alternativa para superar la limitación de nervio donante, son los aloinjertos descelularizados obtenidos mediante tratamientos que se hacen al nervio donante para remover los aloantígenos (e.g. Avance® Nerve Graft, aprobado por la FDA). Estos han mostrado buenos resultados promoviendo la regeneración nerviosa, sin embargo, el empleo de detergentes y enzimas para eliminar compuestos celulares y el proceso de esterilización, aumentan su costo y limitan el acceso de la mayoría de la población a los mismos. Además, el proceso de descelularización debe garantizar la eliminación de componentes que afectan la actividad y el crecimiento axonal [1]. Por eso, se han desarrollado

conductos de diferentes materiales naturales y sintéticos que guían la regeneración de nervio periférico cuando se injertan en una lesión que por su tamaño no permite que los muñones nerviosos sean suturados.

Diferentes tipos de conductos, elaborados con materiales naturales o sintéticos biodegradables, se usan como guías del crecimiento axonal y facilitadores de la reconexión nerviosa. Entre los materiales naturales se encuentran proteínas o péptidos (colágeno, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina y seda), polisacáridos (quitina, alginato, ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos) y algunos poliésteres [poli (3 hidroxibutirato) o P3HB y poli (3 ácido hidroxibutírico-co-3 ácido hidroxivalérico)]. Entre los materiales de origen sintético están el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico poliglicólico (PLGA), policaprolactona (PCL) y poliuretanos (PUs) [8]. Cuando los conductos - denominados *Nerve Guidance Conduit* o NGC - solicitan licencia de agencias regulatorias de alimentos y medicamentos de diferentes países para aplicar en el tratamiento de lesiones de nervio periférico humano, son evaluados como dispositivos médicos [1].

Una patente otorgada en los Estados Unidos de América [US 4955893, Sep. 11, 1990] describió un método de producción de un implante para reparar y/o regenerar tejido nervioso lesionado, constituido por un cilindro con poros unidireccionales y biodegradable hecho de colágeno tipo I y glicosaminoglicano (GAG), entrecruzada o no por calentamiento al vacío o exposición a glutaraldehído. En el método patentado se dispensa una suspensión acuosa de colágeno y GAG en moldes cilíndricos de silicona que son colocados verticalmente sobre una bandeja de un liofilizador preenfriado. La bandeja preenfriada y la atmósfera enfriada del liofilizador establecen un gradiente de congelamiento en el cilindro que permite la formación de cristales de hielo que crecen preferencialmente en forma vertical desde la parte de la suspensión en contacto con la superficie de la bandeja hacia el extremo opuesto de la suspensión. Su liofilización resulta en la formación de un tapón de colágeno-GAG con poros o canales orientados preferencialmente paralelamente al eje del molde de silicona que lo contiene. El template poroso resultante se usa como implante nervioso y fue diseñado para eliminar el uso de autoinjerto en la reparación de nervios seccionados que no pueden ser suturados.

Otra patente (US 2011/0129515 A1, Jun. 2, 2011), basada en la anterior, reportó el desarrollo de un soporte biodegradable de colágeno I-GAG con poros orientados unidireccionalmente para promover la migración de axones y células de Schwann a lo largo del eje de un nervio seccionado, durante la regeneración de nervio periférico en lesiones más grandes que las lesiones tratadas con los soportes elaborados en moldes cilíndricos de silicona. El conducto constituido por un tubo hueco de material biodegradable (e.g.: NeuraGen®) que en su interior contiene una matriz biodegradable porosa de colágeno-GAG con poros orientados paralelamente al eje del tubo y que van de un extremo a otro del conducto, a diferencia del producto de la patente anterior. Para su elaboración, se usa un dispositivo de congelamiento que aísla térmicamente al tubo biodegradable que contiene la suspensión de colágeno I-GAG empleada para formar la matriz interna. Este dispositivo mantiene al tubo en posición vertical cuando entra en contacto con el líquido de enfriamiento, previene la formación de gradientes térmicos radiales y promueve el crecimiento axial de los cristales de hielo que al ser liofilizados producen los poros alineados paralelamente al eje del conducto. El conducto puede hacerse de diferentes diámetros o tamaños, pero en la cirugía estos diámetros no son ajustables al diámetro de los muñones en caso de que no coincidan. Empleando el procedimiento descrito se produce NeuraGen 3D, un conducto aprobado por la FDA constituido por un tubo de colágeno tipo I que contiene una matriz interna de colágeno tipo I y condroitin-6-sulfato orientada axialmente. Su microestructura interna proporciona una guía para el crecimiento axonal que controla los brotes nerviosos desordenados y facilita la reconexión axonal guiada. Preclínicamente, se ha visto que este producto incrementa la regeneración a límites similares a los del autoinjerto en modelo murino [9]. También, que cuando se implanta en modelos animales de lesiones de nervio periférico inducen

mayor regeneración axonal que los conductos que son huecos o que contienen rellenos con microestructura multidireccional en su interior [10].

La patente CN106267368B describe la aplicación de cetuximab y un soporte de colágeno cargado con cetuximab para la preparación de un fármaco que busca reparar la lesión de la médula espinal, y también proporciona un material de soporte de colágeno de regeneración nerviosa cargado con cetuximab. Sin embargo, esta patente solo refiere un soporte unidireccional en pro de la regeneración del nervio.

El artículo “Human Schwann Cells Seeded on a Novel Collagen-Based Microstructured Nerve Guide Survive, Proliferate, and Modify Neurite Outgrowth” de van Neerven et. al., 2014 presenta una variedad de nuevas guías nerviosas bioartificiales que han sido probadas preclínicamente por su seguridad y propiedades de apoyo a la regeneración nerviosa. Divulgan un modelo *in vitro* con células de Schwann humanas (hSCs) como un paso intermedio hacia la aplicación clínica de la guía nerviosa [20].

Se conocen otros conductos de colágeno con morfología tubular hueca, desafortunadamente su eficacia es menor que la de los autoinjertos, que siguen siendo considerados el tratamiento estándar, y la de los conductos con rellenos unidireccionales [11]. Datos preclínicos de los conductos tubulares huecos obtenidos en modelos murinos con escisiones de nervios ciáticos de diferentes longitudes (5, 10 y 14 mm), indican diferencias en el tiempo de reparación y el grado de recuperación total sensorial o motora [8]. La eficacia real de estos NGC en humanos varía dependiendo de la lesión; sin embargo, resultados de ensayos clínicos indican que los NGC aprobados por la FDA y CE pueden ser efectivos en lesiones menores a 30 mm, que es un tamaño inferior al tamaño crítico (40 mm) de lesiones de nervio periférico humanas [1,12].

Otro tipo de implante de colágeno biodegradable aprobado para uso humano, utiliza una lámina para envolver los nervios periféricos lesionados (e.g., NeuraWrap®). Aunque este tipo de producto se basa en soportes laminares de colágeno, contrariamente al producto que reivindicamos en esta invención, carece de microestructura interna direccionada que guíe el crecimiento axonal. Por eso, NeuraWrap® y productos similares se utilizan como una interfase no constrictiva que separa al nervio lesionado del ambiente tisular que lo rodea [13] y no para direccionar la regeneración de los axones nerviosos.

Aunque los conductos tubulares con relleno interno de colágeno-glicosaminoglicano desarrollados por las invenciones mencionadas se fabrican de diferentes diámetros, estos son diámetros fijos que pueden ser mayores o menores al diámetro del nervio que se quiere reconectar. Esto puede ser un inconveniente porque durante la cirugía cuando los diámetros del conducto y los muñones no coinciden, las probabilidades de que el injerto falle aumentan [14], lo cual, obliga a disponer de conductos de diámetros diferentes para encontrar el que coincida con el de los muñones del nervio seccionado. El conducto que se hace con los soportes de colágeno tipo I porosos, laminares -no cilíndricos como los descritos en las dos invenciones citadas- y que poseen dos fases continuas con orientación de poro diferente de esta invención, se ajusta al diámetro de los muñones que se quiere reconectar dependiendo del número de plegamientos que se hagan de la zona unidireccional del soporte. Una vez formado el cilindro con poros o canales unidireccionales la zona multidireccional adyacente lo cubre y forma una barrera que controla la migración de células, como los fibroblastos, que dificultan el proceso de reconexión guiada del axón. El procedimiento de su obtención se basa en el congelamiento diferencial -en dos pasos- de dos dispersiones de colágeno tipo I de diferentes concentraciones servidas en un mismo dispositivo y no en dispositivos diferentes. En el primer paso, se sirve una dispersión de colágeno tipo I de menor concentración en una sección de un dispositivo de congelamiento que permite la formación de cristales de hielo unidireccionales a -78.5 °C (o menos) y que se separa del resto con una barrera de material antiadherente. A diferencia de lo que ocurre en

los dispositivos verticales, en este procedimiento el agua de la dispersión de colágeno cristaliza horizontalmente y en paralelo a la superficie del molde en que se ha creado el gradiente de concentración. Por eso, la nucleación de los cristales de hielo no ocurre verticalmente en un ángulo de 90° a la superficie de congelamiento como en las patentes mencionadas inicialmente. En el segundo paso, después del primer congelamiento, se remueve la barrera que separa la primera sección y se sirve la dispersión de colágeno tipo I de mayor concentración en la parte restante del dispositivo. Luego de que esta dispersión se deja interactuar con la dispersión de colágeno con cristales unidireccionales obtenida en el primer congelamiento a -78.5 °C, se congela a -20 °C para que se formen cristales de agua orientados aleatoriamente en diferentes direcciones (multidireccionalmente). Luego, las dispersiones de colágeno tipo I congeladas diferencialmente se liofilizan para obtener soportes laminares porosos constituidos por dos zonas adyacentes y continuas con orientación de poro diferente (unidireccional y multidireccional). Estos soportes al ser humedecidos y plegados desde la zona de poros unidireccionales hasta la zona de poros multidireccionales, forman conductos ajustables. La ajustabilidad del diámetro de los conductos elaborados con este procedimiento, es otra gran diferencia con los conductos que contienen rellenos unidireccionales de colágeno u otros componentes.

PROBLEMA TÉCNICO

La mayoría de los conductos para regeneración nerviosa guiada basados en colágeno tipo I que han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y que cuentan con la certificación European Conformity (CE) de su cumplimiento con las normas de salud, seguridad y protección del medio ambiente europeas, son estructuras tubulares huecas que una vez se suturan a los muñones proximales y distales de un nervio seccionado lo reconectan. Por eso, carecen de una microestructura interna que facilite la adhesión y migración guiada de las células asociadas con los muñones de los nervios periféricos que conectan. Lo cual, dificulta el crecimiento axonal requerido para promover la reconexión adecuada de los axones seccionados. En menor proporción, se han registrado conductos con microestructura interna con poros unidireccionales que favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación de células de Schwann y el crecimiento axonal guiado. Todos estos conductos, con o sin microestructura interna, están limitados por el tamaño de la lesión, ya que al momento de la cirugía no pueden ser adaptados al diámetro de los muñones lesionados [1]. Por lo tanto, existe la necesidad de elaborar soportes laminares bifásicos que permitan ajustar el diámetro del conducto que se forma durante la intervención quirúrgica al diámetro de los muñones del nervio periférico lesionado. Para resolver este problema técnico la invención proporciona soportes de colágeno tipo I laminares bifásicos con dos zonas con orientación de poro diferente: una con poros unidireccionales diseñada para formar la matriz o relleno interior del conducto; otra, con poros orientados multidireccionalmente diseñada para envolver el interior unidireccional del conducto y constituir la superficie externa del mismo. Los soportes al plegarse de la zona unidireccional a la multidireccional forman una matriz cilíndrica de colágeno tipo I con poros o canales unidireccionales orientados a lo largo de la longitud del conducto y no interconectados. La matriz unidireccional, después de formada es cubierta por el soporte con poros multidireccionales que actúa como barrera migratoria de células indeseadas y proporciona resistencia mecánica. Este diseño permite formar un conducto que se puede adaptar al diámetro de los muñones de los nervios periféricos seccionados durante la reparación de nervios periféricos. La invención, también proporciona el método para la elaboración de estos soportes.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Imagen representativa del análisis con microscopía electrónica de barrido de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I. Claramente se identifican la zona con poros/canales unidireccionales (A), la interfase (B) y la zona con poros orientados aleatoriamente (C).

Figura 2. Microscopia electrónica de barrido de la zona unidireccional de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I. (A) Corte transversal que muestra poros no interconectados; (B) Corte longitudinal que evidencia la formación de canales unidireccionales no interconectados.

Figura 3. Secuencia de imágenes que ilustran el plegamiento de los soportes desde la zona unidireccional hasta la zona multidireccional. (A) Soporte laminar de 1cm² humedecido; (B) Enrollamiento del soporte desde el borde de la zona unidireccional hasta la zona multidireccional; (C) Cubrimiento del borde libre de la zona multidireccional con pegamento natural; (D) Conducto relleno con una matriz de colágeno tipo I con poros unidireccionales cubierto por una envoltura laminar multidireccional.

Figura 4. Apariencia del conducto hidratado con medio de cultivo y plegado de forma que la fase con canales unidireccionales quede en el interior y la fase multidireccional quede en el exterior. (A) Vista transversal; (B) Vista lateral.

Figura 5. Determinación de glutaraldehído remanente en los soportes laminares de colágeno tipo I bifásicos

Figura 6. Porcentaje de degradación enzimática del soporte laminar bifásico de colágeno tipo I entrecruzado con 0.06% v/v glutaraldehído.

Figura 7. Evaluación del módulo de Young de soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I, no entrecruzados (NC) y entrecruzados con diferentes concentraciones (0.02 a 0.1 v/v) de glutaraldehído (P1-P5).

Figura 8. Determinación de la carga eléctrica superficial de soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I no entrecruzados (0%) y entrecruzados con diferentes concentraciones (0.02 a 0.1 v/v) de glutaraldehído. Zona multidireccional (M) y zona unidireccional (U).

Figura 9. Implantación del conducto elaborado con el soporte laminar bifásico de colágeno tipo I entrecruzado con 0.06% v/v de glutaraldehído en un modelo murino de lesión de nervio ciático mayor al tamaño crítico (1 cm). (A) Vista lateral del conducto elaborado con el soporte laminar de colágeno tipo I bifásico durante la cirugía para reconectar los muñones del nervio ciático de rata; (B) Vista frontal del conducto; (C) Apariencia del nervio ciático reconectado con el conducto después de 12 semanas de haber realizado el injerto; (D) Apariencia del nervio ciático reconectado con el nervio ciático invertido después de 12 semanas de haber realizado el injerto (control positivo-gold standard); (E) Apariencia del nervio ciático no injertado después de 12 semanas de haber realizado el (control negativo, tamaño crítico de la lesión).

Figura 10. Imagen representativa de un cultivo *in vitro* de células de Schwann aisladas del nervio ciático de ratones neonatos sembradas en la zona unidireccional del soporte bifásico de colágeno tipo I entrecruzado con 0.06% de glutaraldehído. Después de 7 días de cultivo las células se inmunotñieron con el marcador de células de nervio periférico S100b.

Figura 11. Espectrosocopia infrarroja con transformada de fourier. (A) Espectros representativos de las zonas multidireccionales de los soportes entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído (P1-P5), soportes no entrecruzados (NC) y gelatina (G). (B) Espectros representativos de las zonas unidireccionales de los soportes entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído (P1-P5), soportes no entrecruzados (NC) y gelatina (G).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El método objeto de la invención sirve para elaborar soportes laminares constituidos por dos zonas o fases continuas (unidireccional y multidireccional) y una interfase entre ellas (**Figura 1**).

El dispositivo de congelamiento empleado para cristalizar el agua de la dispersión de colágeno tipo I (5 mg/g) unidireccionalmente, se sella con una tapa y se mantiene en un ambiente cerrado adiabático hasta que ocurra el congelamiento unidireccional de la dispersión de colágeno.

El área de los soportes bifásicos puede ser igual o mayor 10 cm². La parte unidireccional forma canales no interconectados a lo largo de su microestructura (**Figura 2**).

Al ser plegados desde la zona unidireccional hasta la zona multidireccional, los soportes forman conductos constituidos por un relleno interior con poros unidireccionales y una cubierta exterior con poros multidireccionales (**Figura 3**).

El diámetro de los conductos depende del número de plegamientos del soporte unidireccional y del grosor de la lámina, por eso, se puede ajustar para que coincida con el diámetro de los muñones que se quieren conectar (entre 1 y 8 mm). Para ejemplificar, la **Figura 4** muestra un conducto cilíndrico, no hueco, con un diámetro de 3mm.

Los conductos elaborados se estabilizaron mediante entrecruzamiento con glutaraldehído preferiblemente pero también se pueden usar compuestos o tratamientos como genipina, carbodiimida, tratamiento hidrotérmico, radiación ultravioleta, derivados epóxicos, ácido cítrico o glioxal. Los niveles residuales del agente entrecruzante fueron menores a 0.6 ng/g de soporte (**Figura 5**).

Los conductos son reabsorbible porque los soportes bifásicos con que se elaboran son biodegradables. Estos datos sugieren que *in vivo* el conducto se reabsorbe en periodos de tiempo mayores al mes, garantizando que en la medida en que esto ocurre los axones proximales migren guiadamente hasta que se reconecten (**Figura 6**).

La evaluación del Módulo de Young de los conductos hechos con los soportes entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído (0.02 a 0.1% v/v) demostró que el conducto entrecruzado con 0.06%, escogido para evaluar el crecimiento y diferenciación de las células primarias de Schwann, posee un módulo (0.437 MPa) que es similar al Módulo de Young del nervio ciático de rata (0.576 ± 0.16 MPa) [15]. Lo cual, sugiere que el conducto tiene la flexibilidad y resistencia requerida para evitar la compresión de los axones *in vivo* (**Figura 7**).

La carga eléctrica superficial de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I, no entrecruzados o entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído, indica que el potencial Z del soporte entrecruzado con 0.06% de glutaraldehído es negativo en la zona multidireccional y positivo en la zona unidireccional (**Figura 8**). Lo anterior sugiere que *in vivo* la cubierta multidireccional con poros aleatorios de los conductos no favorece la adhesión de fibroblastos, mientras que, la zona unidireccional promueve la adhesión y proliferación de las células de Schwann [16,17].

Cuando *in vivo* el conducto se forma y ajusta al diámetro de los muñones de los nervios seccionados, la zona multidireccional del soporte envuelve una sola vez el relleno interno unidireccional; después, se fija con sutura o adhesivos tisulares (**Figura 9**).

Los soportes bifásicos son citocompatibles porque las células de Schwann que se siembran en la zona unidireccional se adhieren y crecen orientadas en la misma dirección de los poros/canales que caracterizan la microestructura de esta zona (**Figura 10**).

El proceso de elaboración de los soportes laminares bifásicos, no entrecruzados (NC) o entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldeído (P1-P5), no afecta las características del colágeno tipo I nativo (**Figura 10**).

En una modalidad el colágeno tipo I con que se elabora el soporte laminar bifásico es obtenido de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, murinos, humanos, peces u otra fuente animal por hidratación ácida empleando ácidos orgánicos (acético, cítrico, ascórbico, propanoico, fórmico, láctico) o ácidos inorgánicos (clorhídrico, fosfórico, sulfúrico) cualquier otro ácido débil; se puede emplear o no pepsina o tripsina u otra enzima para su extracción. También, a partir de otros biomateriales naturales y sintéticos.

En una modalidad el método de congelamiento utiliza nitrógeno líquido, mezcla de CO₂ sólido con isopropanol, cualquier otro sistema líquido subenfriado que permita alcanzar -78.5 °C, así como, cualquier otro método de enfriamiento.

En una modalidad de obtención del soporte laminar bifásico el colágeno es entrecruzado con glutaraldehído, genipina, carbodiimida, tratamiento hidrotérmico y otros procedimientos de entrecruzamiento durante un período entre 12 y 36 horas a una temperatura entre 15°C y 39°C con agitación horizontal a una frecuencia entre 100-200 rpm.

En una modalidad el procedimiento de obtención del soporte laminar bifásico incluye la esterilización con óxido de etileno, radiaciones ionizantes (alfa, beta, gamma) o no ionizantes (UV, microondas, rayos X), con fluidos supercríticos u otros métodos de esterilización.

En otro aspecto el soporte laminar bifásico de colágeno tipo I se corta de acuerdo con el tamaño requerido, se humecta con agua estéril para inyección o solución salina o PBS estéril, fluidos autólogos como el plasma sanguíneo y otras soluciones o suspensiones humectantes bioseguras. Luego, se pliega dejando la fase con canales unidireccionales en el interior y la fase multidireccional en el exterior de acuerdo con el diámetro y la longitud del conducto deseada.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN PRÁCTICA

Ejemplo Experimental 1. Elaboración de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I plegables.

Para la elaboración de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I se emplearon moldes de material antiadherente de 10 x 10 cm. Se prepararon dispersiones de colágeno tipo I de 5 mg/g en una solución de ácido acético 0.05M, pH 2 a 3, para la fase unidireccional y 8 mg/g para la fase multidireccional, que fueron entrecruzadas con glutaraldehído (0.02 a 0.1% v/v) durante 24 h a 37°C en un agitador orbital a 150 rpm. La dispersión de colágeno de 5 mg/g se sirvió primero en una sección del molde delimitada por un separador de material antiadherente, con una de sus paredes en contacto con una superficie que proporciona una temperatura menor a -78.5°C. Luego de este congelamiento, el separador de material antiadherente se removió, se adicionó la dispersión de colágeno de 8 mg/g, se deja interactuar con la dispersión previamente congelada y se congeló a -20°C. Finalmente, las dos dispersiones congeladas diferencialmente se liofilizaron a 100 mTorr por 48 horas. El aspecto del soporte con las dos zonas, unidireccional y multidireccional, se presenta en la **Figura 1**.

Ejemplo Experimental 2. Análisis con microscopía electrónica de barrido de la microestructura de la zona unidireccional de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I.

El análisis con microscopía electrónica de barrido de la zona unidireccional evidenció la formación de poros o canales no interconectados unidireccionales (**Figura 2**).

Ejemplo Experimental 3. Formación de los conductos cilíndricos que contienen una matriz interna con poros o canales unidireccionales rodeada por una envoltura con poros multidireccionales.

Los soportes laminares bifásicos (10 cm²) se recortaron para obtener soportes con un área de 1 cm². La zona unidireccional de las muestras se humedeció con solución salina esteril y se enrolló. Finalizado el enrollamiento, se humedeció la zona multidireccional y se plegó sobre el soporte cilíndrico formado por el enrollamiento de la zona unidireccional. El borde de la zona multidireccional se fijó a la superficie con un pegante natural (**Figura 3, Figura 4**).

Ejemplo Experimental 4. Evaluación del glutaraldehído residual.

Para la evaluación del glutaraldehído residual, se tomaron muestras (1 cm²) de las zonas unidireccional y multidireccional de soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I entrecruzados con diferentes concentraciones del agente entrecruzante (0.02 a 0.1% v/v) y se incubaron (12 h, 60 ° C) con 1 mL de una solución 1 M de NaOH, 0.1 M de glicina y 0.1 M Na₂SO₃. Después de centrifugar (400 X g, 5 min), se tomaron alícuotas de los sobrenadantes (100 µL) y se midió su absorbancia a 238 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva de calibración hecha con concentraciones conocidas de glutaraldehído (**Figura 5**).

Ejemplo Experimental 5. Evaluación de la degradación enzimática de un soporte laminar bifásico entrecruzado con 0.06% v/v de glutaraldehído.

Se tomaron muestras (1 cm²) de las zonas unidireccional y multidireccional del soporte laminar bifásico de colágeno tipo I entrecruzado con 0.06% de glutaraldehído. Las muestras se incubaron con colagenasa tipo I durante un mes y a diferentes tiempos se hicieron las mediciones de productos de la degradación del colágeno (**Figura 6**).

Ejemplo Experimental 6. Evaluación del módulo de Young de soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído.

Soportes (4 cm²) no entrecruzados y entrecruzados con diferentes concentraciones de glutaraldehído, se humedecieron y se enrollaron desde la zona unidireccional a la zona multidireccional para formar los conductos no entrecruzados (NC) y entrecruzados (P1-P5), cada zona tenía la misma área. El módulo de Young de los conductos se calculó a partir de la pendiente de la curva tensión-deformación (**Figura 7**).

Ejemplo Experimental 7. Determinación de la carga eléctrica superficial de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo I.

El potencial eléctrico (potencial Zeta) de la superficie de las zonas unidireccionales y multidireccionales de los soportes laminares bifásicos de colágeno tipo se midió con un Zetasizer Nano ZS (**Figura 8**).

Ejemplo Experimental 8. Implantación de un conducto nervioso plegables bifásicos en un modelo de lesión de nervio ciático de rata.

Se injertó un conducto nervioso elaborado con el soporte plegable bifásico de colágeno tipo I entrecruzado con 0.06% v/v de glutaraldehído en un modelo murino de lesión de nervio ciático mayor al tamaño crítico 1cm (**Figura 9**). El cirujano plástico que realizó el procedimiento quirúrgico pudo plegar el soporte humedecido con PBS de la zona unidireccional a la zona multidireccional y ajustar el diámetro del conducto al diámetro de los muñones del nervio ciático seccionado. El soporte se fijó en los extremos lesionados del nervio intervenido con un pegante de natural y sutura quirúrgica. Transcurridos 4 meses de realizado el injerto, el conducto elaborado con el soporte restauró la continuidad del nervio ciático seccionado y fue remodelado. En el nervio lesionado injertado con el fragmento invertido obtenido al crear la lesión (control positivo), también se observó restablecimiento de la continuidad de forma similar a como ocurrió con el conducto elaborado con el soporte objeto de esta invención. En el grupo de animales cuyas lesiones no fueron injertadas (control negativo) para demostrar que la lesión causada por su tamaño no podía repararse espontáneamente, se observó la presencia de brotes axonales desorganizados que no fueron observados en los grupos de animales autoinjertados con nervio ciático invertido o injertados con el conducto producido con el soporte reivindicado en esta invención.

Ejemplo Experimental 9. Crecimiento *in vitro* de células de Schwann en un conducto nervioso plegable bifásico de colágeno tipo I con poros unidireccionales y multidireccionales

Se sembraron células de Schwann -aisladas de nervio ciático de ratones neonatos- en la zona unidireccional del soporte bifásico de colágeno tipo I entrecruzado con 0.06% de glutaraldehído y se cultivaron por 7 días. Los cultivos se fijaron, se inmunotñeron con el anticuerpo S100b para detectar la expresión de este marcador característico de las células de nervio periférico. Claramente se aprecia la adhesión y alineación de las células a las fibras unidireccionales de los poros unidireccionales de la zona analizada (**Figura 10**).

Ejemplo Experimental 10. Análisis FTIR de los soportes laminares de colágeno tipo I bifásicos.

Se hizo un análisis espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FTIR) de las zonas unidireccionales y multidireccionales de los soportes laminares bifásicos para evaluar las características químicas del colágeno tipo I después de su procesamiento. Los espectros de las muestras secas (2 mg) fueron obtenidos con un espectrofotómetro FT/IR-4200 (Jasco, Germany), en el rango de 4000-500 cm^{-1} con una resolución de 8 cm^{-1} y 150 corridas/muestra (**Figura 11**). Los resultados indican que las propiedades químicas del colágeno no fueron afectadas por el proceso de elaboración de los soportes.

Conclusiones:

El conducto que hace parte de esta invención es diferente de otros conductos autorizados por agencias regulatorias para uso humano. Por ejemplo, el conducto Neuragen 3D™ está constituido por una matriz externa de colágeno tipo I y una matriz interna de colágeno tipo I y condroitin-6-sulfato orientada axialmente, no está hecho a partir de un solo soporte y no se puede ajustar durante el acto quirúrgico a los diámetros de los muñones nerviosos que reconecta [9]. Los conductos de colágeno tipo I NeuraGen®, Neuromatrix™ y NeuroFlex™ son tubos de colágeno I huecos que presentan una microestructura multidireccionada en las paredes porque son hechos con soportes multidireccionales de este material [18]. Estos conductos, al igual que Neurogen 3D™ tienen diámetros fijos. Neurawrap™, es un soporte laminar reabsorbible no restrictivo porque presenta una apertura lateral cuyos bordes se pueden suturar entre sí después de ajustar al diámetro del nervio lesionado; al ser una envoltura externa, actúa como interfase entre el nervio lesionado y el tejido que lo rodea [13]. En este

mismo tipo de producto se encuentra NeuroMend TM, una envoltura de colágeno tipo I que se usa en el tratamiento de nervios periféricos mínimamente dañados[19].

REFERENCIAS

- [1] S. Kehoe, X.F. Zhang, D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy, *Injury*. (2012). doi:10.1016/j.injury.2010.12.030.
- [2] G. Lundborg, A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance, *J. Hand Surg. Am.* (2000). doi:10.1053/j.hsu.2000.4165.
- [3] R. Rebowe, A. Rogers, X. Yang, S. Kundu, T. Smith, Z. Li, Nerve Repair with Nerve Conduits: Problems, Solutions, and Future Directions, *J. Hand Microsurg.* (2018). doi:10.1055/s-0038-1626687.
- [4] D. Grinsell, C.P. Keating, D. Grinsell, C.P. Keating, Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 1–13. doi:10.1155/2014/698256.
- [5] D.M. Wojtkiewicz, J. Saunders, L. Domeshek, C.B. Novak, V. Kaskutas, S.E. Mackinnon, Social impact of peripheral nerve injuries, *Hand*. (2015). doi:10.1007/s11552-014-9692-0.
- [6] L. Rasulić, A. Savić, F. Vitošević, M. Samardžić, B. Živković, M. Mićović, V. Baščarević, V. Puzović, B. Joksimović, N. Novakovic, M. Lepić, S. Mandić-Rajčević, Iatrogenic Peripheral Nerve Injuries—Surgical Treatment and Outcome: 10 Years' Experience, *World Neurosurg.* (2017). doi:10.1016/j.wneu.2017.04.099.
- [7] N.F. Sachanandani, A. Pothula, T.H. Tung, Nerve gaps, *Plast. Reconstr. Surg.* (2014). doi:10.1097/01.prs.0000436856.55398.0f.
- [8] D. Arslantunali, T. Dursun, D. Yucel, N. Hasirci, V. Hasirci, Peripheral nerve conduits: Technology update, *Med. Devices Evid. Res.* (2014). doi:10.2147/MDER.S59124.
- [9] 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.* (2019). doi:10.3389/fbioe.2019.00337.
- [10] Y. Kim, V.K. Haftel, S. Kumar, R. V. Bellamkonda, The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging long peripheral nerve gaps Young-tae, *Biomaterials*. 29 (2009) 3117–3127.
- [11] Y. tae 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*. (2008). doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.042.
- [12] M.F. Meek, J.H. Coert, US Food and Drug Administration /Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves., *Ann. Plast. Surg.* (2008). doi:10.1097/SAP.0b013e31804d441c.
- [13] <https://www.integralife.com/neurawrap-nerve-protector/product/nerve-tendon-neurawrap-nerve-protector> sitio consultado el 22/02/2020, (n.d.).
- [14] J. Isaacs, S. Mallu, W. Yan, B. Little, Consequences of oversizing: Nerve-to-nerve tube diameter mismatch, *J. Bone Jt. Surg. - Am. Vol.* (2014). doi:10.2106/JBJS.M.01420.
- [15] G.H. Borschel, K.F. Kia, W.M. Kuzon, R.G. Dennis, Mechanical properties of acellular peripheral nerve, *J. Surg. Res.* (2003). doi:10.1016/S0022-4804(03)00255-5.
- [16] 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 nanomatrices as efficient platforms for modulating cell adhesion and shape, *Tissue Eng. - Part C Methods*. (2012). doi:10.1089/ten.tec.2011.0731.

- [17] M. Dadsetan, A.M. Knight, L. Lu, A.J. Windebank, M.J. Yaszemski, Stimulation of neurite outgrowth using positively charged hydrogels, *Biomaterials*. (2009). doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.018.
- [18] <https://www.integralife.com/neuragen-nerve-guide/product/nerve-tendon-neuragen-nerve-guide> sitio consultado el 22/02/2020, (n.d.).
- [19] Stryker Orthopaedics, NeuroMend TM, Copyr. © 2008 Stryker. (2008). http://az621074.vo.msecnd.net/syk-mobile-content-cdn/global-content-system/SYKGCSDOC-2-8815/5ELECL1xVVNyObcwjWuDbwFmhp08ww/LNMCW_OT.pdf (accessed February 23, 2020).
- [20] Van Neerven, S. G., Krings, L., Haastert-Talini, K., Vogt, M., Tolba, R. H., Brook, G., ... & Bozkurt, A. (2014). Human Schwann cells seeded on a novel collagen-based microstructured nerve guide survive, proliferate, and modify neurite outgrowth. *BioMed research international*, 2014.