

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**GENERACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VIVO* DE MODELOS BIO-
ARTIFICIALES DE NERVIOS PERIFÉRICOS DESCELULARIZADOS DE
ESTRUCTURA Y VISCO-ELASTICIDAD CONTROLADAS**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



Tesis doctoral de:

Óscar Darío García García

Realizado bajo la dirección de:

Dr. Víctor S. Carriel Araya

Dr. Fernando Campos Sánchez

2021

**GENERACION Y EVALUACION *IN VIVO* DE MODELOS BIO-
ARTIFICIALES DE NERVIOS PERIFÉRICOS DESCELULARIZADOS DE
ESTRUCTURA Y VISCO-ELASTICIDAD CONTROLADAS.**

Memoria presentada por **D. Óscar Darío García García**,
Graduado en Bioquímica con mención en Biotecnología y
Máster en Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas para aspirar al título de
**Doctor en Biomedicina por la Universidad de Granada
con Mención Internacional**

Fdo.: Óscar Darío García García

Fdo.: Dr. Víctor S. Carriel Araya

Doctor en Biomedicina

Universidad de Granada, España

Doctor en Health Sciences

Universidad de Gante, Bélgica

Fdo.: Dr. Fernando Campos Sánchez

Doctor Biomedicina

Universidad de Granada, España

Departamento de Histología

Universidad de Granada

2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Óscar Darío García García
ISBN: 978-84-1117-603-3
URI: <https://hdl.handle.net/10481/78925>

El doctorando/ *The doctoral candidate*, **Oscar Darío García García**, y sus directores de tesis/ and his thesis supervisors, **Dr. Víctor Sebastián Carriel Araya** y **Dr. Fernando Campos Sánchez**,

Garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos con otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Firman en Granada a 10 de noviembre de 2021

Dr. Víctor S. Carriel Araya
Director de tesis/Thesis supervisor

Dr. Fernando Campos Sánchez
Director de tesis/Thesis supervisor

Óscar Darío García García
Doctorando/Doctoral candidate

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en las instalaciones del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada parcialmente por el Grupo de Investigación CTS-115 y por los proyectos de investigación: FIS PI17/393 y FIS PI20/318 del Plan nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (cofinanciados por fondos FEDER, UE); proyecto P18-RT-5059, Proyectos I+D+I, Plan Andaluz de Investigación Desarrollo e Innovación (PAIDI 2020), Junta de Andalucía. España; proyecto A-CTS-498-UGR18, Proyectos I+D+I del Programa Operativo FEDER 2018, Junta de Andalucía, Universidad de Granada; y proyectos CS PI-0257-2017 y CSyF PE-0395-2019, Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía, España.

El doctorando, D. Óscar Darío García García realizó este proyecto de Tesis Doctoral en la Universidad de Granada gracias a contratos asociados a proyectos de investigación adjudicados por el citado grupo de investigación.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico original:

1. **Óscar Darío García-García**, Marwa El Soury, David González-Quevedo, David Sánchez-Porras, Jesús Chato-Astrain, Fernando Campos, Víctor Carriel
Histological, Biomechanical, and Biological Properties of Genipin-Crosslinked Decellularized Peripheral Nerves

Int J Mol Sci. 2021 Jan 12;22(2):674. doi: 10.3390/ijms22020674.

Factor de Impacto: 5.924; **Categoría:** Biochemistry & molecular biology; **Cuartil:** 1, **JIF Percentil:** 77.46

La presente Tesis Doctoral se desarrolló en el marco de una colaboración internacional, con lo cual se opta al **Grado de Doctor con Mención Internacional**. El doctorando, D. Óscar Darío García García realizó una estancia de investigación predoctoral bajo la supervisión de la Profa. Dra. Stefania Raimondo, profesora de Anatomía Humana, en el Departamento de Ciencias Clínicas y Biológicas de la Universidad de Turín, Directora del grupo de investigación de *Regeneración Nerviosa* ubicado en el Hospital San Luigi, Orbassano, Turín, Italia. Esta estancia se desarrolló en el período comprendido entre el 28/04/2021 y el 29/07/2021 (3 meses).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser referencia y soporte fundamental, por haberme dando la confianza y libertad siempre de elegir y demostrar. Por haberme inculcado que no existe límite si se aplican los valores del esfuerzo, la constancia y perseverancia.

A mis hermanos, Teresa y Carlos, por ser refugio y por enseñarme tanto aun siendo tan diferentes.

A mis abuelos, por ser ejemplo de vida y humanidad.

A mi familia en toda su extensión, especialmente a mis primos Agustín, Arturo, Teresa, Curro, Tono, Nano, y un largo etc., porque demuestran la definición de familia siendo apoyo y escape en todas las situaciones de la vida.

A todos mis tíos, en especial a mis padrinos Charo y Paco, porque me han educado como un hijo más, siendo hogar y enseñándome que el trabajo y la vida te pueden enseñar más que cualquier título universitario, porque con sus valores me han llevado a ser lo que soy hoy en día.

A mis directores de tesis, por haberme guiado en este aprendizaje, tanto en lo profesional como en lo personal, con tanta paciencia y dedicación. Al profesor Víctor Carriel por confiar en mí desde un primer momento y darme la oportunidad de demostrar de lo que uno es capaz. Al profesor Fernando Campos, por creer en mí e introducirme en el mundo de la investigación enseñándome de modo tan cercano.

A mis compañeros de laboratorio Jesús, Marwa, Dani, David, Fabi, Cristina Olimpia, y Miguel, por hacer de mi laboratorio mi segunda casa, por el apoyo continuo, las risas y ayuda en este camino que por momentos parece inalcanzable e interminable. Sin vosotros no hubiera sido posible.

Al profesor Antonio Campos, por ser fuente de inspiración y entusiasmo constante. Por recordarnos la importancia que tiene la humanística en la ciencia en el día a día, por su cercanía y querer sacar lo mejor de cada uno de nosotros.

A la profesora M^a del Carmen Sánchez Quevedo, por hacerme sentir tan valorado y animarme a no tirar la toalla cuando parece que nada sale como debería, por ser la mezcla perfecta entre disciplina y cariño.

A los profesores del departamento Miguel Alaminos, Vicente, Miguel Ángel, José Manuel, Ingrid, Ismael Rodríguez, Javier Cañizares, y al resto de profesores, por ofrecerme siempre su ayuda y enseñarme tanto.

A las profesoras Stefania Raimondo, Giovanna Gambarotta y a todo el grupo de Regeneración Nerviosa de la Universidad de Turín, por enseñarme y acogirme con tanto cariño en mi estancia en Italia y hacerme sentir uno más en toda esta experiencia.

A mis amigos de toda la vida, Alberto, Pedro, Rubén, Adri, Rancho, Jonhy, Juan, Juanlu, Chori, Hinojosa, por demostrar que la amistad verdadera perdura por mucho tiempo que pase sin vernos.

A mis amigos Rumba y Luna, por estar ahí siempre que los he necesitado.

A mis amigos de Granada, Xavi, Anita, Edu, Alicia, Lucia, Cristina por hacerme disfrutar tanto de esta tierra hasta sentirla como propia.

En definitiva, a todas las personas que no he nombrado pero que han contribuido con su granito de arena a ser quien soy hoy y a este logro. Sin vosotros no hubiera sido posible. Gracias a todos.

Lista de Abreviaciones:

AB: Azul alcían

ADSC: Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo

ALT: Alanina transaminasa

AMYL: amilasa

AND: Aloinjerto nervioso descelularizado

AST: Aspartato aminotransferasa

AUTO: Grupo autoinjerto

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

BILT: Bilirrubina total

BMSC: Células mesenquimales derivadas de la médula ósea

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CK: Creatina quinasa

CMO: Células de la mucosa olfativa

CRE: Creatinina

CS: Célula de Schwann

CTR: Grupo control no operado

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDAC: Carbodiimida

FDA: *Food and Drug Administration*

FNP: Fibras nerviosas periféricas

GAG: Glucosaminoglicanos

GAP-43: Proteína de crecimiento asociada 43

GFL: Ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de las células gliales

GLUC: glucosa

GP: Genipín

HBSS: Solución salina tamponada de Hank

HDLC: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad

HE: Hematoxilina-eosina (método de coloración)

HGB: Hemoglobina

IRON: hierro

IT: Ingeniería tisular

L/D: *Live/Dead[®] Cell Viability Assay*

LDLC: Colesterol de lipoproteína de baja densidad

LYM: Linfocitos

MCOLL: Mielina-colágeno (método histoquímico)
MCV: Volumen corpuscular medio
MEB: Microscopía electrónica de barrido
MEC: Matriz extracelular
MET: Microscopía electrónica de transmisión
MPV: Volumen medio de plaquetas
MXD: Recuento de células mixtas
NAT: Nervio nativo
NEUT: Neutrófilos
NFL: Neurofilamento
NGF: Factor de crecimiento neural
NP: Nervio periférico
ON: *Overnight*
PAA: Ácido peracético
PCL: Policaprolactona
PGA: Ácido poliglicólico
PLA: Ácido poliláctico
PLGA: Ácido poliláctico coglicólico
PS: Picosirius
rADSC: Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo de rata
RBC: Recuento de glóbulos rojos
RS: Método de descelularización de Roosens
SB: Sulfobetaina
SBF: Suero bovino fetal
SD: Método de descelularización de Sondell
SDC: Deoxicolato de sodio
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SFI: Índice funcional ciático
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
TA: Temperatura ambiente
TRIGL: Triglicéridos
UREA: Urea
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VIM: Vimentina
WBC: Recuento de glóbulos blancos

ÍNDICE

I RESUMEN.....	12
1 Resumen	13
2. Summary	16
II INTRODUCCIÓN	19
III ESTADO DEL ARTE.....	21
1. Ingeniería Tisular.....	22
1.1 Conceptos básicos	22
1.1.1. Células.....	23
1.1.2. Matrices extracelulares	25
1.1.3. Factores de crecimiento.....	28
2. Bases estructurales del sistema nervioso periférico	29
2.1 Características generales.....	29
2.1.1 Histología del nervio periférico.....	29
Parénquima	29
Estroma	32
2.2 Lesiones del nervio periférico.....	33
2.2.1 Degeneración y regeneración de los nervios periféricos ...	34
2.2.2 Estrategias de reparación de los nervios periféricos.....	36
Reparación directa.....	38
Autoinjertos.....	38
Aloinjertos	39
3. Ingeniería Tisular del nervio periférico.....	41
3.1 Descelularización.....	42
3.1.1 Tipos de descelularización.....	44
Métodos Físicos.....	44
Métodos Químicos	44
Métodos Biológicos	47
3.2 Conductos bioartificiales.....	48
3.3 Funcionalización de los substitutos nerviosos generados. ..	50
3.3.1 Crosslinkers o agentes entrecruzantes.....	50
3.3.2 Células.....	51
3.3.3 Biomoléculas.....	52
IV HIPÓTESIS	55

V	OBJETIVOS.....	57
	Objetivo general	58
	Objetivos específicos:	58
VI	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
	1. Generación de aloinjertos nerviosos descelularizados funcionalizados con genipín	60
	1.1 Obtención de nervios y proceso de descelularización	60
	1.2 Entrecruzamiento químico con genipín.....	61
	1.3 Caracterización histológica y ultraestructural	62
	1.4 Determinación del contenido de ADN remanente.....	64
	1.5 Caracterización biomecánica	65
	1.6 Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i> (interacción célula-biomaterial).....	65
	1.7 Análisis estadísticos.....	67
	2. Optimización de un nuevo método de descelularización para nervio periférico.....	68
	2.1 Diseño y generación de nuevos métodos de descelularización neural.....	68
	2.2 Caracterización histológica y estructural.....	69
	2.3 Análisis bioquímicos de la matriz extracelular resultante	70
	2.4 Caracterización biomecánica y transparencia	71
	2.5 Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i> (interacción célula-biomaterial).....	71
	3. Estudios preclínicos de los nuevos aloinjertos descelularizados en el modelo de lesión de nervio ciático de ratas:.....	72
	3.1 Procedimientos quirúrgicos y grupos de estudio experimentales.....	72
	3.2 Evaluación <i>in vivo</i> de los sustitutos nerviosos descelularizados para la reparación del nervio periférico	72
	3.2.1 Evaluación clínico-funcional.....	72
	3.2.2 Análisis hematológicos y serológicos	73
	3.3. Estudios post-mortem	74
	3.3.1 Evaluación morfométrica muscular.....	74
	3.3.2 Análisis histológico y estructural	75
	3.3.3 Análisis histomorfométrico y ultraestructural	75

VII	RESULTADOS.....	77
	1 Generación de aloinjertos nerviosos descelularizados funcionalizados con genipín	78
	1.1 Caracterización histológica y estructural.....	78
	1.2 Determinación del contenido de ADN remanente.....	84
	1.3. Caracterización biomecánica	85
	1.4 Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i> (interacción célula-biomaterial).....	86
	2. Optimización de un nuevo método de descelularización para nervio periférico.....	90
	2.1 Diseño y generación de nuevos métodos de descelularización neural.....	90
	2.2 Caracterización histológica y estructural.....	90
	2.3 Análisis bioquímicos de la matriz extracelular resultante	95
	2.4 Caracterización biomecánica y transparencia	96
	2.5 Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i> (interacción célula-biomaterial).....	98
	3. Estudios preclínicos de los nuevos aloinjertos descelularizados en el modelo de lesión de nervio ciático de ratas:.....	101
	3.1 Evaluación <i>in vivo</i> de los sustitutos nerviosos descelularizados para la reparación del nervio periférico	101
	3.1.1. Evaluación clínico-funcional.....	101
	3.1.2 Evaluación hematológica y serológica.....	102
	3.2. Estudios post-mortem	104
	3.2.1 Resultados morfométricos musculares	104
	3.2.2 Resultados histológicos y estructurales de la regeneración nerviosa.....	107
	3.2.3 Resultados histomorfométricos y ultraestructurales de la regeneración nerviosa.....	110
VIII	DISCUSIÓN	114
IX	CONCLUSIONES.....	131
	1. VERSIÓN EN ESPAÑOL	132
	2. ENGLISH VERSION	134
X	BIBLIOGRAFIA	136

I RESUMEN

1 Resumen

La Ingeniería Tisular tiene por objetivo generar tejidos artificiales, cada vez más biomiméticos y biocompatibles, que le permitan reparar, restaurar o incluso mejorar las funciones de tejidos y órganos dañados. Para ello la ingeniería tisular está enfocada actualmente en la búsqueda y desarrollo de nuevos biomateriales y técnicas de biofabricación que los guíe a tales fines. Sin embargo, a pesar del gran avance conseguido en este campo, los métodos de biofabricación actuales no consiguen alcanzar el grado de complejidad histológica, composición tisular y molecular de algunos órganos, como es el caso del nervio periférico. En este sentido, la técnica de descelularización tisular ha surgido como una alternativa prometedora en este campo. Este método permite la generación de sustitutos y/o matrices acelulares que conservan la disposición estructural y composición molecular de la mayoría de componentes de la matriz extracelular, obteniendo un biomaterial natural altamente biomimético que provee un microambiente pro-regenerativo para la regeneración de tejidos humanos como el nervio o la piel.

En este contexto, los aloinjertos nerviosos acelulares representan una alternativa prometedora a la reparación de lesiones nerviosas estructurales, ya que tienen una aceptable capacidad para promover la regeneración tisular y recuperación funcional. Sin embargo, todo proceso de descelularización puede conllevar una alteración de las características de dicha matriz extracelular, pudiendo llegar a comprometer las propiedades estructurales, biomecánicas y/o biológica de los mismos. Por lo tanto, es necesario generar nuevos protocolos de descelularización tisular orientados a una eficiente eliminación del componente celular, una adecuada preservación de la matriz extracelular y nuevas estrategias para preservar o incrementar sus propiedades biomecánicas.

A este respecto, en la presente Tesis Doctoral se han abordado dos principales estrategias para la generación de nuevos sustitutos de nervio periférico mediante ingeniería tisular, que podrían ser también aplicados a otros tejidos como la piel humana. En primer lugar, se evaluó el impacto del entrecruzamiento químico con el agente natural genipín en sustitutos de nervio descelularizados previamente descritos (métodos de Sondell y Roosens). El objetivo de esta primera estrategia fue generar matrices neurales con propiedades mecánicas mejoradas. El

impacto de dos concentraciones de genipín (0.10 y 0.25%) en las matrices neurales descelularizadas fue evaluado a nivel histológico, biomecánico y biológico. En segundo lugar, se desarrollaron tres nuevos métodos de descelularización química con el objetivo de lograr un grado eficiente de eliminación del componente celular y una adecuada preservación de la estructura y composición de la matriz extracelular neural. Estos nuevos aloinjertos neurales descelularizados fueron sometidos a una completa caracterización *ex vivo* y posteriormente se evaluó su eficacia terapéutica *in vivo*.

En el primer estudio, la histología confirmó las diferencias entre los métodos de Sondell y Roosens, y que el entrecruzamiento con genipín no indujo cambios histológicos evidentes, corroborando una adecuada preservación de la histología del nervio. La prueba biomecánica de tracción reveló que genipín mejoró las propiedades biomecánicas de los aloinjertos nerviosos descelularizados de Sondell y Roosens, siendo estos últimos los más comparables al comportamiento biomecánico de los nervios nativos utilizados como control. La evaluación de la biocompatibilidad de los aloinjertos nerviosos descelularizados realizada con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, y cultivadas sobre las matrices generadas, confirmó un alto grado de biocompatibilidad en todos los grupos. Los resultados fueron especialmente positivos en el grupo Roosens tratados con 0,10% de genipín. Finalmente, este estudio demostró que el uso de genipín podría ser una alternativa eficiente para mejorar las propiedades biomecánicas de los aloinjertos nerviosos descelularizados con un ligero impacto en la biocompatibilidad y el patrón histológico. Por estas razones, planteamos la hipótesis de que nuestros nuevos aloinjertos nerviosos descelularizados reticulados podrían ser una alternativa adecuada para futuros estudios preclínicos *in vivo*.

En segundo lugar, se llevó a cabo una completa caracterización (histológica, ultraestructural, bioquímica, biomecánica y de biocompatibilidad) de los tres nuevos aloinjertos descelularizados de nervio periférico. En estos tres nuevos métodos químicos-enzimáticos se utilizaron diferentes concentraciones de detergentes (Tritón X-100, dodecil sulfato de sodio, desoxicolato de sodio) y enzimas (ARNasa y ADNasa) o, en su defecto, una solución de ácido peracético, y se compararon con la eficacia del método de Sondell. El análisis histológico

demostró una eliminación de material celular y mielina eficiente. El análisis de la matriz extracelular confirmó un alto grado de preservación de las fibras de la matriz, así como de la glicoproteína laminina, especialmente en los protocolos 1 y 2. Por último, no se observaron cambios significativos a nivel biomecánico, y las todas las matrices mostraron un alto grado de biocompatibilidad *ex vivo*.

En función de los resultados *ex vivo*, se seleccionaron los protocolos 1 y 2, cuya eficacia regenerativa fue evaluada a las 15 semanas tras la reparación de defectos de 10-mm de longitud en el nervio ciático de ratas. Se utilizaron como controles, el método *gold standard* y sustitutos descelularizados obtenidos mediante la técnica de Sondell. El análisis clínico y funcional confirmó un grado de recuperación motora y sensitiva parcial y comparable al autoinjerto nervioso. La evaluación histológica, inmunohistoquímica, ultraestructural y morfométrica confirmó la regeneración del tejido nervioso a lo largo de los injertos implantados, siendo, siendo el Protocolo 2 el protocolo el más eficaz, ya que los resultados fueron comparables al grupo autoinjerto, pero sin lograr superarlo.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral avalan por un lado, la utilización de genipín para generar sustitutos nerviosos descelularizados biocompatibles con propiedades biomecánicas mejoradas. Por otro lado, ha sido posible desarrollar un nuevo método de descelularización neural altamente eficiente, cuyos resultados *in vivo* fueron comparables al autoinjerto nervioso. Estos resultados sugieren que estos nuevos aloinjertos descelularizados podrían ser una terapéutica en la reparación quirúrgica de lesiones de nervios periféricos y podrían tener utilidad en la regeneración de otras estructuras como la piel humana.

2. Summary

The aim of tissue engineering is to generate artificial tissues, increasingly biomimetic and biocompatible, that allow repairing, restoring or even improving the functions of damaged tissues and organs. To this end, tissue engineering is currently focused on searching for and developing new biomaterials and biofabrication techniques to guide them to such ends. However, despite the great progress achieved in this field, current biofabrication methods are unable to reach the degree of histological complexity, tissue and molecular composition of some organs, such as the peripheral nerve. In this sense, the technique of tissue decellularization has emerged as a promising alternative in this field. This method allows the generation of substitutes and/or acellular matrices that preserve the structural arrangement and molecular composition of most of the components of the extracellular matrix, obtaining a highly biomimetic natural biomaterial that provides a pro-regenerative microenvironment for human tissue regeneration such as nerve or skin.

In this context, acellular nerve allografts represent a promising alternative to structural nerve injury repair, as they have an acceptable capacity to promote tissue regeneration and functional recovery. However, any decellularization process can lead to an alteration of the characteristics of the extracellular matrix, which can compromise their structural, biomechanical and/or biological properties. Therefore, it is necessary to generate new tissue decellularization protocols oriented to an efficient removal of the cellular component, an adequate preservation of the extracellular matrix and new strategies to preserve or increase its biomechanical properties.

In this regard, two main strategies in order to generate new peripheral nerve substitutes by tissue engineering were addressed in the present PhD Thesis, which could also be applied to other tissues such as human skin. First, the impact of chemical crosslinking with the natural agent genipin on previously described decellularized nerve substitutes (Sondell and Roosens methods) was evaluated. The aim of this first strategy was to generate neural matrices with improved mechanical properties. The impact of two concentrations of genipin (0.10 and 0.25%) on decellularized neural matrices was evaluated at the histological,

biomechanical and biological levels. Secondly, three new chemical decellularization methods were developed with the aim of achieving an efficient degree of cellular component removal and adequate preservation of neural extracellular matrix structure and composition. These new decellularized neural allografts were subjected to a complete *ex vivo* characterization and subsequently evaluated for their therapeutic efficacy *in vivo*.

In the first study, histology confirmed the differences between the Sondell and Roosens methods, and the crosslinking with genipin did not induce obvious histological changes, corroborating adequate preservation of nerve histology. Biomechanical tensile testing revealed that genipin improved the biomechanical properties of decellularized Sondell and Roosens nerve allografts, being the latter the most comparable to the biomechanical behavior of native nerves used as controls. Evaluation of the biocompatibility of decellularized nerve allografts performed with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured on the generated matrices confirmed a high degree of biocompatibility in all groups. The results were especially positive in the Roosens group treated with 0.10% genipin. Finally, this study demonstrated that the use of genipin could be an efficient alternative to improve the biomechanical properties of decellularized nerve allografts with a slight impact on biocompatibility and histological pattern. For these reasons, we hypothesized that our new crosslinked decellularized nerve allografts could be a suitable alternative for future *in vivo* preclinical studies.

Secondly, a complete characterization (histological, ultrastructural, biochemical, biomechanical and biocompatibility) of the three new decellularized peripheral nerve allografts was carried out. In these three new chemical-enzymatic methods, different concentrations of detergents (Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, sodium deoxycholate) and enzymes (RNAase and DNAase) or, alternatively, a peracetic acid solution were used and compared with the efficacy of Sondell's method. Histological analysis demonstrated efficient removal of cellular material and myelin. Extracellular matrix analysis confirmed a high degree of preservation of matrix fibers as well as laminin glycoprotein, especially in protocols 1 and 2. Finally, no significant changes were observed at the biomechanical level, and all matrices showed a high degree of *ex vivo* biocompatibility.

Based on the *ex vivo* results, protocols 1 and 2 were selected, whose regenerative efficacy was evaluated at 15 weeks after repair of 10-mm-gap defects in the sciatic nerve of rats. The gold standard method and decellularized substitutes obtained by the Sondell technique were used as controls. Clinical and functional analysis confirmed a degree of partial motor and sensory recovery comparable to the nerve autograft. Histological, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evaluation confirmed the regeneration of nerve tissue along the implanted grafts, being protocol 2 the most effective, since the results were comparable to the autograft group, but without surpassing it.

Finally, the results obtained in this Doctoral Thesis support, on the one hand, the use of genipin to generate biocompatible decellularized nerve substitutes with improved biomechanical properties. On the other hand, it has been possible to develop a new highly efficient neural decellularization method, whose *in vivo* results were comparable to nerve autografting. These results suggest that these new decellularized allografts could be a therapeutic in the surgical repair of peripheral nerve injuries and could be potentially useful for the regenerative treatment of diseases affecting other tissues such as the human skin.

II INTRODUCCIÓN

La Ingeniería Tisular (IT) se ha establecido en los últimos años como una de las disciplinas con mayor impacto en la investigación biomédica actual, siendo uno de los pilares que junto con la terapia celular y la terapia génica constituyen las tres modalidades de Terapias Avanzadas. La IT por tanto ofrece soluciones a problemas clínicos actuales mediante la generación de tejidos artificiales biomiméticos y funcionales que sirven de herramientas terapéuticas con el fin de reparar y regenerar de tejidos y órganos dañados.

La presente Tesis Doctoral se enfoca en la generación de nuevas estrategias de IT para la producir sustitutos nerviosos que puedan ser utilizados en la reparación de lesiones estructurales de nervio periférico. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han evaluado dos estrategias de generación de sustitutos nerviosos descelularizados. En primer lugar, se propuso la generación de sustitutos nerviosos descelularizados con propiedades estructurales y biomecánicas mejoradas mediante el entrecruzamiento o *crosslinking* con el agente químico genipín (GP). En segundo lugar, se abordará el diseño y evaluación de nuevos métodos de descelularización para generar aloinjertos descelularizados (ANDs) que mejoren la eficacia de regeneración presentada por los actuales métodos.

A este respecto, en esta Tesis Doctoral, se abordará en primer lugar el estado del arte, donde se considerarán las características generales de la IT, las bases conceptuales del sistema nervioso periférico y su regeneración y por último como aprovechando los mecanismos de regeneración nerviosa la IT ha desarrollado diferentes estrategias para solventar la reparación de lesiones nerviosas severas. A continuación, se presenta el problema de investigación, la hipótesis y objetivos del presente proyecto. Tras estos apartados, se presenta la metodología empleada para generar los diversos ANDs y su evaluación *in vitro* e *in vivo*. Finalmente se presentaron los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y las conclusiones obtenidas en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

III ESTADO DEL ARTE

1. Ingeniería Tisular

1.1 Conceptos básicos

La Ingeniería Tisular (IT) se ha definido como un área multidisciplinar de la investigación biomédica que combina técnicas utilizadas en los campos de la biología, química, medicina e ingeniería con el fin de diseñar y generar tejidos artificiales para uso clínico. Pese a que el término de IT fue citado por primera vez por Fung en 1985 en la reunión de la *National Science Foundation* [1], en Virginia (EEUU), la expansión y generalización del término no se produjo hasta 1993 con la publicación del trabajo titulado “*Tissue Engineering*” en la revista *Science* de Robert Langer y Joseph Vacanti.

La introducción del término y la disciplina en España fue llevada a cabo por el profesor Antonio Campos Muñoz, quien en el 2004 la define como “*la construcción de tejidos artificiales y su utilización para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los tejidos orgánicos*” durante su discurso de toma de posesión en la Real Academia Nacional de Medicina de España, Madrid [2].

Desde entonces y hasta la actualidad, numerosos trabajos se han sucedido con la finalidad de construir tejidos y órganos biomiméticos para la resolución y mejora de problemas clínicos actuales ocasionados por alguna lesión y/o enfermedad [3-5]. El uso de tejidos artificiales como sustitutos no es solo importante como acto terapéutico en sí mismo, sino como acción paliativa para mejorar la calidad de vida de las personas en ciertas circunstancias, como por ejemplo el uso de injertos bioartificiales en grandes quemados [6].

Además, la IT constituye en la medicina actual una alternativa importante a los problemas que pueden generar un trasplante para algunas localizaciones o la imposibilidad de llevar a cabo el mismo. Esto, junto con su reciente consideración como medicamento ha generado la necesidad de desarrollar cada vez más controles de calidad y más exhaustivos durante su proceso de biofabricación. De acuerdo con las recientes normativas europeas y de otros países, dicha consideración exige una serie de controles de calidad no solo para su aprobación sino para su posterior fabricación en condiciones de calidad farmacéutica debido

a la finalidad de su uso terapéutico (Directiva Europea 2003/63/EC) (Reglamento 1394/2007) (Directiva 2009/120/CE) [7-9].

Todo ello ha ocasionado que sea tal la importancia de esta nueva disciplina, que junto con la terapia celular y la terapia génica constituyen las tres modalidades de Terapias Avanzadas que con mayor impacto han irrumpido en la medicina de los últimos cuarenta años [3].

Es importante resaltar que la IT se basa sobre tres herramientas fundamentales para la generación de tejidos artificiales (Figura 1), las células, las matrices extracelulares o biomateriales y los factores de crecimiento [10-12]. La gran variedad de características que pueden ofrecer cada uno de estos elementos abre un abanico de múltiples posibilidades.

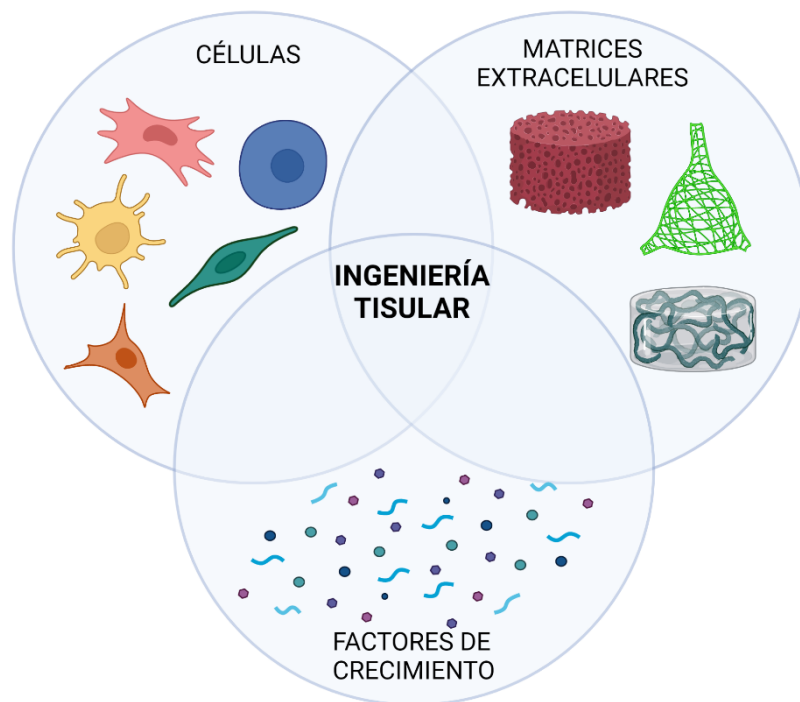


Figura 1: Elementos fundamentales de la Ingeniería Tisular (elaborado en la aplicación en línea Biorender.com).

1.1.1. Células

Previo a la generación de un tejido artificial, es imprescindible conocer los principios sobre los que se crean los sistemas vivos, siendo las células el componente básico, funcional y estructural [13]. Estos componentes difieren en cuanto a su función, morfología, fenotipo, origen embrionario, actividad

metabólica y capacidad de regeneración [14-16]. En todas estas diferencias radica la necesidad de conocer y comprender los distintos mecanismos que utilizan las células para regenerar y construir un nuevo tejido bajo condiciones fisiológicas normales. Durante este complejo proceso se llevan a cabo distintos comportamientos biológicos en los que se pueden destacar dos circunstancias en las que se desarrollan gran parte de las potencialidades celulares, concretamente el desarrollo morfo-genético normal y la cicatrización [2]. En primer lugar, las células que se localizan en una zona más próxima a la lesión pueden llevar a cabo la restauración del daño mediante un mecanismo conocido como transdiferenciación. Durante este proceso las células diferenciadas se diferencian (transdiferenciación) en otros fenotipos sin pasar por un estadio intermedio de desdiferenciación [17,18]. Por otro lado, aquellas células que intervienen en el proceso de reparación deben de ser capaces de dividirse y dar origen a nuevas células hijas diferenciadas y funcionales [19]. Podríamos decir que pueden considerarse células madre, y aunque hasta el momento no existe un acuerdo universal sobre la definición de célula madre. Hoy en día se acepta que las células madre se caracterizan por poseer una gran capacidad de proliferación asimétrica, un carácter indiferenciado y la capacidad para originar células hijas destinadas a la diferenciación terminal [2]. A diferencia de lo que ocurre con las células totipotentes o pluripotentes del embrión, ha sido clásicamente aceptado que las células madre se diferencian hacia los elementos maduros del tejido en el que se localizan. La extensa gama de posibilidades de diferenciación por parte de estas células genera un amplio abanico de posibilidades para la IT, a pesar de que se desconocen muchos de los procesos biológicos que intervienen en dicha diferenciación [2].

De este modo, en la generación de tejidos artificiales podemos utilizar dos alternativas: el uso de células madre específicas del tejido que se desea construir, o por el contrario, emplear fuentes celulares alternativas con capacidad para llevar a cabo el proceso de diferenciación o transdiferenciación [20]. Una vez seleccionados los tipos celulares con los que se desea trabajar durante la generación del tejido artificial es necesario realizar la expansión celular. Durante este proceso se deben de asegurar unas condiciones de esterilidad del cultivo celular, estando libre de patógenos y de contaminación.

En lo que respecta a las células adultas diferenciadas, son con frecuencia más difíciles de expandir *in vitro*, ya que por lo general presentan una capacidad de proliferación limitada dificultando la obtención de un número adecuado de las mismas durante un periodo de tiempo razonable[21]. Sin embargo, estas células son las más eficientes para promover la generación en laboratorio de tejidos biomiméticos y funcionales, debido a que presentan las características fenotípicas y funcionales del tejido que se desea generar. No obstante, es importante poner de relieve que la gran mayoría de las células adultas diferenciadas disminuyen su viabilidad, expresión génica, función y diferenciación cuando se aíslan y se expanden *in vitro* [10,22,23]. Esto ocasiona que durante la generación de tejidos artificiales mediante IT sea más frecuente el uso de células madre, ya que ofrecen ventajas técnicas como su gran capacidad de proliferación y autorenovación [24-26].

Por último, se puede clasificar en relación a su origen, los tres tipos de células con los que se trabajan en IT:

- a) Células autólogas, son aquellas que proceden del propio individuo y se caracterizan por presentar un mínimo riesgo de respuesta inmunológica postimplantación.
- b) Células alogénicas, son aquellas que proceden de otro individuo de la misma especie y que ofrecen la ventaja de poder ser almacenadas en biobancos con carácter previo a su utilización.
- c) Células xenogénicas, proceden de un individuo de otra especie, lo que supone un importante riesgo de rechazo inmunológico [20,27,28].

1.1.2. Matrices extracelulares

Además de la composición celular, durante la elaboración de tejidos artificiales mediante IT, es importante conocer la composición histológica, molecular y las propiedades físicas y químicas del tejido que se desea reparar. La mayoría de los tejidos corporales están compuestos por una combinación de distintas poblaciones celulares inmersas en una matriz extracelular (MEC) especializada [29,30]. Cada tejido presenta unas características químicas, físicas y estructurales propias que vienen determinadas por la adecuada proporción y distribución de

sus células, fibras y sustancia fundamental [15,31]. En este sentido, el uso de un biomaterial de estructura y composición química similar a la MEC nativa de un determinado tejido u órgano es fundamental para generar un sustituto biomimético mediante IT. Debido a que los biomateriales ejercen de andamios moleculares donde se deben favorecer los procesos celulares y moleculares de regeneración en un tejido concreto, estos deben aportar la estructura, tridimensionalidad y propiedades biomecánicas necesarias para la recuperación funcional [32].

De este modo, los biomateriales se definen como “aquel componente del tejido artificial que actúa como soporte estructural tridimensional y puede actuar como un sistema de transporte de células o sustancias químicas tales como factores de crecimiento y señales moleculares”, es decir, como la MEC nativa [33].

Para que un biomaterial pueda emplearse en la generación de un tejido artificial debe de cumplir unos estándares básicos. En primer lugar, deben ser química y estructuralmente estables, inertes y, además presentar propiedades físicas y estructurales adecuadas [34-36]. Es muy importante que sean biocompatibles con las células que se encuentran inmersas en él, y en especial con el organismo receptor [12,37]. Es decir, no debe ser tóxico ni ocasionar respuesta inmunológica en el huésped. Los biomateriales además deben de actuar como vehículo para las células, favoreciendo la función celular, como es la adhesión, migración, proliferación y diferenciación al igual que la MEC nativa [37,38]. Todas estas propiedades varían en función de la aplicación a la que este destinada el biomaterial, ya que estos deben de tener un comportamiento muy similar al del tejido nativo a reparar, o en su defecto acelerar el proceso de regeneración tisular. Al mismo tiempo, los biomateriales deben favorecerse su manipulación e implantación *in vivo* [33,39-42].

La naturaleza química del biomaterial va a afectar al impacto biológico en la función celular o respuesta del huésped. A pesar de que existen diversos criterios que permiten clasificar los biomateriales empleados en IT, el más utilizado obedece a la naturaleza de los mismos. Según este criterio, los biomateriales pueden ser clasificados como naturales y sintéticos [20,33,43]. Los biomateriales naturales suelen ser los más utilizados en IT debido a su alto grado de

biocompatibilidad y biodegradación. Sin embargo, estos suelen tener una estabilidad mecánica muy variable, y el control de la densidad, porosidad, anisotropía, y propiedades biomecánicas siguen siendo un desafío [2,4,12,39,44]. Por otro lado, estos biomateriales están compuestos por motivos moleculares que los hacen altamente bioactivos y, por lo tanto, favorecen las interacciones células-biomaterial [28]. Además, compuestos como el colágeno o la fibrina pueden generarse en forma de hidrogeles poliméricos, presentando la gran ventaja de reproducir los niveles de hidratación de los tejidos nativos y, por lo tanto, favoreciendo el intercambio y difusión de diversas sustancias (nutrientes, desechos, electrolitos y gases).

En relación a los biomateriales sintéticos, estos son generalmente polímeros de naturaleza química conocida, y ofrecen ventajas como la regulación de los parámetros estructurales (forma, densidad, porosidad y biomecánica). Además, una gran variedad de estos polímeros son altamente biocompatibles y han sido aprobados para su uso clínico por la *Food and Drug Administration* (FDA) [43,45]. No obstante, aunque muchos de estos biomateriales se encuentran catalogados como biocompatibles, suelen ser hidrófobos y liberan sustancias tóxicas durante el proceso de biodegradación [37,43,46], lo que genera la necesidad de realizar procesos de funcionalización con componentes naturales [12,15,30].

Debido a esto, podemos decir que no existe un biomaterial idóneo, y que en muchos casos la combinación de varios tipos de biomateriales es la estrategia con mejores resultados, como es el caso de la fibrina-agarosa. Sin embargo, en muchos casos el órgano o tejido que se quiere fabricar tiene unas características histológicas y estructurales difíciles de conseguir con los métodos de biofabricación actuales. Por ello, en los últimos años muchas investigaciones se han centrado en el desarrollo de técnicas de descelularización tisular. Esta metodología consiste en la eliminación del contenido celular del tejido nativo, alterando de forma mínima la estructura tridimensional de la MEC resultante, obteniendo un biomaterial natural no inmunogénico que suele presentar las propiedades biomecánicas y ultraestructurales adecuadas, promoviendo la regeneración del tejido en cuestión [47].

A este respecto, en este proyecto de Tesis Doctoral se estudia la generación de nuevos substitutos nerviosos descelularizados, así como la funcionalización de los mismos, lo cual puede suponer un avance en el campo de la IT proveyendo nuevas estrategias terapéuticas que podrían ser utilizadas en la reparación quirúrgica de lesiones de nervio periférico.

1.1.3. Factores de crecimiento

Además del componente celular y los biomateriales, existe una amplia gama de factores tanto físicos como químicos que son denominados generalmente como factores de crecimiento o inductores. Estos factores de crecimiento juegan un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular, repercutiendo en la funcionalidad del tejido artificial generado [20,28]. Estos factores de crecimiento son una serie de sustancias de composición química muy variable, que pueden influir y modificar el comportamiento celular a través de la unión a receptores específicos [16]. Estas uniones desencadenan respuestas mediante la activación de diferentes vías de señalizaciones moleculares y biológicas que conducen a la división, migración, diferenciación, mantenimiento del fenotipo o la apoptosis. La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido conduce a la definición estructural y funcional del tejido en un momento temporal determinado [20,28,48].

Muchos de los eventos producidos durante el desarrollo humano tienen lugar a lo largo de los procesos de regeneración tisular, como ocurre a nivel de los nervios periféricos y tejidos esqueléticos [12,15]. Debido a esto, el conocimiento del desarrollo humano es crucial para comprender la regeneración tisular, y por tanto para diseñar estrategias de IT en concordancia [49,50].

Generalmente los factores de crecimiento se incorporan directamente a los cultivos celulares a través del medio de cultivo. Sin embargo, también suelen ser empleados en combinación con biomateriales y/o diversos tipos de nanopartículas [51]. La funcionalización de estos biomateriales con estos factores de crecimiento tiene dos objetivos claros: por un lado, aportar una función nueva a los mismos y, por otro lado, la liberación controlada de los factores en el microambiente regenerativo del andamio generado o en el huésped [12,35,48,52].

2. Bases estructurales del sistema nervioso periférico

2.1 Características generales

El sistema nervioso (SN) consiste en una red altamente organizada, formada por neuronas y sus células de soporte, las células gliales, que se extiende por todo nuestro cuerpo y son las encargada de recibir la información, procesarla y generar respuestas concretas [29].

Desde el punto de vista anatómico, el SN puede dividirse en el sistema nervioso central (SNC), compuesto por el encéfalo, el nervio óptico y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP) formado por los ganglios nerviosos, los nervios periféricos (NP) y las terminaciones nerviosas, los cuales conforman una red encargada de asegurar la comunicación motora, sensorial y autonómica entre el SNC y los órganos diana.

2.1.1 Histología del nervio periférico

Desde el punto de vista funcional, estos órganos están especializados en la conducción de impulsos nerviosos eléctricos que permiten al SNC coordinar las funciones motoras y sensoriales del cuerpo [12]. La función motora periférica se subdivide en sistema nervioso somático o voluntario y sistema nervioso autónomo (vegetativo) o involuntario. Para llevar a cabo estas funciones, los nervios periféricos (NP) poseen una compleja estructura histológica y composición molecular [12]. Histológicamente, los NP se organizan en dos tejidos bien definidos: el tejido funcional o parénquima y el tejido conectivo, de soporte o estroma [29,53]. La disposición de la organización del estroma y del parénquima se puede encontrar en la Figura 2.

Parénquima

El parénquima representa el tejido funcional de estos órganos, y su unidad funcional son las fibras nerviosas periféricas (FNP). Las FNP sirven por tanto como vía de comunicación bidireccional entre el SNC y los órganos diana, que según el sentido de esos impulsos nerviosos se pueden dividir en aferentes (sensitivos) y eferentes (motores) [29,53]. Haciendo referencia a su estructura, las FNP están formada por el axón neuronal, su célula de Schwann (CS) circundante

y una membrana basal externa [29]. Los axones están compuestos internamente por una pequeña cantidad de microfilamentos de actina, neurofilamentos (NFLs) abundantes alineados paralelamente y neurotúbulos o microtúbulos [29]. Los NFLs son filamentos intermedios específicos de las neuronas de tipo IV, cuya principal función es controlar el diámetro del axón y, por tanto, la conductancia del mismo. [54]. Los microtúbulos y los filamentos de actina tienen un papel fundamental en la especialización y el crecimiento del axón y proporcionan las vías para el transporte axonal activo de largo y corto alcance [55]. Tanto los microtúbulos como los filamentos de actina son estructuras dinámicas, lo que facilita la remodelación continua del citoesqueleto [54,55]. Desde el punto de vista histológico, según la estrategia adoptada por las CS para envolver a los axones podemos distinguir dos tipos de fibras: fibras nerviosas mielínicas y amielínicas. Las fibras nerviosas mielínicas consisten en un segmento axonal que está envuelto individualmente por una sola CS. La membrana de esta CS envuelve la fibra nerviosa que mediante un proceso de compresión progresivo terminará formando una vaina de mielina multilaminada [16,53]. No obstante, en la continuidad de las vainas de mielina se pueden encontrar regiones donde se pierde la compactación llamadas incisiones de Schmidt-Lanterman [56]. La presencia de esta vaina de mielina de carácter lipídico tiene una función fisiológica crucial, al aumentar exponencialmente la velocidad y eficiencia de conducción saltatoria de los impulsos nerviosos [29,53,57]. En las fibras mielínicas, el segmento axonal ocupado por una CS define un internodo, y el espacio entre dos internodos define un área donde el axón se encuentra descubierto por interdigitaciones de CS colindantes llamada nodo de Ranvier [53,58]. La longitud internodal varía directamente con el diámetro de las fibras, de 150 a 1500 μm [53].

Las fibras amielínicas están compuestas por un grupo de varios axones de pequeño tamaño (0,15-2,00 μm de diámetro) envueltos por una sola CS [53]. Estos axones se reorganizan progresivamente en el citoplasma de la CS y finalmente se separan unos de otros por las extensiones citoplasmáticas de las CS que forman un mesaxón [29]. La superficie axonal está separada de la membrana de la CS por el espacio periaxonal de Klebs que permite la difusión de iones cuando se produce un potencial de acción [59]. Las CS asociadas a los

axones amielínicos suelen denominarse células de Remak [29,53,59]. Las CS y Remak son similares, pero difieren en la expresión de algunas proteínas. En general, ambas células expresan vimentina, proteína S-100, moléculas de superficie (CD56, CD57 y CD146) y moléculas asociadas a la membrana basal [58]. Sin embargo, las células de Remak tienden a expresar la proteína ácida glial fibrilar y carecen de otras proteínas relacionadas con la mielina [29,40]. La membrana basal de las FNP, al igual que otras, está compuesta por un conjunto de moléculas fibrilares y no fibrilares de la MEC, que forman una estructura tubular altamente organizada alrededor de las FNP llamada tubos endoneurales [40,60]. Molecularmente, la MEC está compuesta por isoformas de laminina, entactina/nidógeno, fibronectina, sulfato de heparina, N-sindecano y colágenos (tipos I, III, IV y V) [29,40]. Esta estructura es crucial para el funcionamiento normal de las FNP, y durante la regeneración, estas moléculas, como la laminina, desempeñan un papel fundamental para guiar el proceso de regeneración.

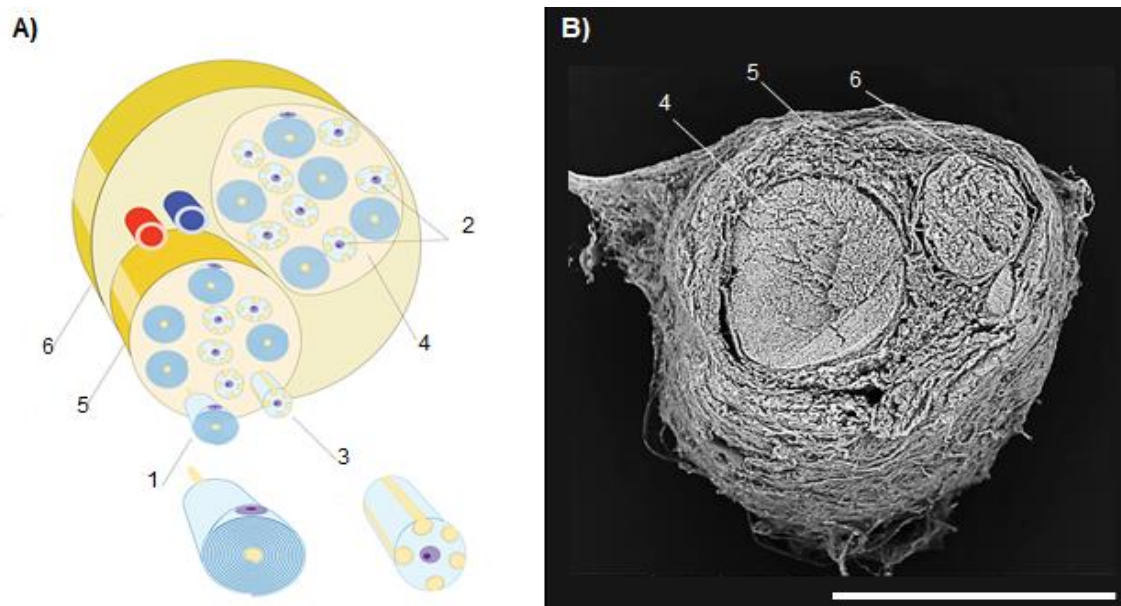


Figura 2: Organización histológica de los nervios periféricos. A) Representación esquemática de la organización del estroma nervioso y del parénquima en un nervio bifasciculado. B) Microscopía electrónica de barrido de una sección transversal del nervio ciático de rata. Barra de escala = 1000 μ m. 1 =fibra nerviosa periférica mielinizada, 2 = Células de Schwann, 3 = fibra nerviosa amielínica, 4 = endoneuro, 5 = perineuro, 6 = epineuro. Imagen modificada de Chato-Astrain, J. and García-García, Ó.D., Campos, F., Sánchez-Porras, D., & Carriel, V. (2020). *Basic Nerve Histology and Histological Analyses Following Peripheral Nerve Repair and Regeneration. Peripheral Nerve Tissue Engineering and Regeneration* (pp. 1-37). Springer International Publishing.

Estroma

Tradicionalmente las funciones del estroma se han limitado al soporte estructural del parénquima, proporcionándole una adecuada resistencia a las fuerzas de estiramiento y compresión aplicadas durante los movimientos corporales. Sin embargo, en los últimos años se le ha atribuido al tejido estromal las funciones de vascularización del parénquima, una función de defensa inmunológica e incluso un papel fundamental en la reorientación de los brotes axonales después de una lesión traumática del NP [29,53]. El tejido estromal se compone de tres capas o tejidos conectivos con diferentes características. Estas capas se distribuyen de la siguiente forma desde la parte más externa a la interna: epineuro, perineuro y endoneuro.

El epineuro es la capa de tejido conectivo más externa que rodea los troncos nerviosos, ya sean uni o multifasciculares. Se trata de un tejido vascularizado relativamente denso que desempeña un papel esencial en el comportamiento biomecánico de estos órganos [60]. Esta capa contiene fibroblastos, mastocitos, colágeno (tipos I y III) y cantidades variables de fibras elásticas y grasa, que parece tener un papel en la protección del nervio que este tejido rodea [53,58]. El número de fascículos y la proporción de tejido conectivo epineural varían entre los nervios y a lo largo de la longitud de un mismo nervio [60]. El patrón de distribución del componente fibrilar de su MEC le permite cierto nivel de flexión, pero restringe el sobre-estiramiento previniendo el desgarramiento durante las actividades físicas [53,60]. Además, el epineuro lleva los principales canales de suministro del sistema vascular intraneural: los *vasa nervorum*, que pasan a través del perineuro para comunicarse con la red de arteriolas y vénulas dentro del endoneuro.

El perineuro es una capa estromal que se extiende desde la zona de transición SNC-SNP hasta la periferia, donde continúa con las cápsulas de los husos musculares y las terminaciones sensoriales encapsuladas. En las terminaciones no encapsuladas y en las uniones neuromusculares el perineuro termina abierto, siendo un punto clave para el intercambio de sustancias en el espacio endoneural [53]. Aunque el perineuro es la capa estromal más fina de estos órganos, es determinante para el comportamiento biomecánico y la resistencia de las fibras nerviosas [40,60]. Esta capa está compuesta por células perineurales

(con morfología aplanada) y capas de MEC alternas, que a través de su compleja organización 3D y de las interacciones célula-célula y célula-ECM constituyen la barrera del nervio periférico o barrera perineural [61]. Las células perineurales son aplanadas y establecen uniones estrechas que confieren las funciones de barrera [61]. Además, cada capa celular está rodeada por una doble membrana basal prominente que, en los NP más grandes, puede tener hasta 500µm de grosor, proporcionando componentes moleculares adicionales a la barrera perineural [60,61]. Entre las capas celulares perineurales y la membrana basal hay fibras colágenas (tipo I, II y III) y elásticas organizadas en disposición circular. Las células perineurales expresan vimentina, proteínas de unión estrecha, citoqueratina 18 y el antígeno de membrana epitelial [62,63].

El endoneuro o tejido conectivo intrafascicular representa un tejido conectivo laxo y blando que conforma la parte interna de los fascículos, y que provee de protección y de las condiciones necesarias para favorecer la función nerviosa. La MEC endoneural se compone por fibras de colágeno, fibras elásticas y algunos proteoglicanos recientemente descritos como decorina, versicán y fibromodulina [29,64]. Esta MEC se organiza en una red capilar y por otro lado los tubos endoneurales, que se componen de dos capas distintas, una membrana externa compuesta por fibras de colágeno orientadas longitudinalmente y otra compuesta por fibras de colágeno orientadas circunferencialmente u oblicuamente fuera de la membrana basal de las fibras nerviosas. Haciendo referencia al componente celular, la MEC contiene fibroblastos, macrófagos y mastocitos. La mayor parte de la población celular del endoneuro está formada por CS y células endoteliales, mientras que los fibroblastos representan sólo el 4% del total [53,65]. En el compartimento endoneural de algunas especies grandes, como los primates y los humanos, es posible encontrar los cuerpos de Renault. Aunque su función no está clara, se cree que podrían proporcionar protección mecánica al parénquima frente a las fuerzas de compresión [29,66].

2.2 Lesiones del nervio periférico

Los NP pueden verse afectados por una gran variedad de patologías, que según su naturaleza, se pueden dividir en neuropatías periféricas (asociadas con la desmielinización de las fibras nerviosas o con la degeneración axonal), y por otro

lado en lesiones estructurales (que pueden ser de origen traumático o iatrogénico) [67,68].

La presente Tesis doctoral se ha centrado en la generación y mejora de nuevos substitutos nerviosos para la reparación de lesiones estructurales periféricas. Por tanto, en las secciones posteriores se desarrollarán los cambios morfológicos y biológicos ocasionados tras el daño estructural nervioso periférico y los factores que afectan a una correcta regeneración, así como las estrategias de reparación de estos órganos.

2.2.1 Degeneración y regeneración de los nervios periféricos

En primer lugar, hay que poner de relieve que en comparación con el SNC, el SNP tiene una mayor capacidad fisiológica para regenerar sus componentes distales tras una alteración estructural [12]. De hecho, uno de los investigadores pioneros en sugerir que tanto los factores celulares como los difusos contribuyen a la regeneración del tejido nervioso fue Ramón y Cajal [69].

Después de que un nervio periférico sufra una lesión traumática, se producen complejos cambios fisiopatológicos, incluyendo cambios morfológicos y metabólicos, en el lugar de la lesión así como en las regiones proximal y distal de la misma [53]. Sin embargo, el grado de recuperación funcional estará condicionado por la gravedad del daño (longitud de lesión nerviosa pequeña o crítica), las estructuras histológicas conservadas, el tratamiento quirúrgico utilizado y el microambiente regenerativo en estas estructuras [70]. A continuación, los principales procesos que se llevan a cabo en las secciones proximales y distales al sitio de lesión serán analizados de forma independiente.

En el momento que ocurre una transección del NP, tanto la interrupción de la comunicación axonal como la pérdida de volumen axoplásmico conllevan un impacto traumático en el cuerpo celular neuronal, lo que produce una serie de profundos cambios morfofuncionales pudiendo alcanzar incluso la muerte celular [53]. La transmisión retrógrada de estas señales hacia el soma neuronal hace que se active el gen *JUN*, el cual está implicado tanto en las etapas iniciales como avanzadas de la regeneración axonal [71]. Se produce por tanto una reorganización del citoplasma perinuclear y los orgánulos, aumentando el

volumen del soma neuronal, desplazamiento del núcleo y de los cuerpos de Nissl hacía la periferia, lo que se conoce como cromatolisis [53]. El cambio morfológico del cuerpo neuronal va acompañado de una transformación funcional, pasando de un estado de transmisión a un fenotipo regenerativo, y por tanto síntesis proteica de sustancias relacionadas con los neurotransmisores se verá modificada a las necesarias para la reconstrucción axonal, tales como factores de crecimiento y proteínas estructurales [53,68].

Asimismo, este proceso provoca una regulación de cientos de genes implicados que conlleva a la generación de cambios iónicos y de excitabilidad [72]. En consecuencia, se regula al alza la generación de diferentes tipos de canales de sodio en la membrana basal que contribuyen a la hiperexcitabilidad eléctrica y a las descargas eléctricas ectópicas en el lugar de la lesión y en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal [53,72]. Además se observa una disminución de canales de potasio, que podría representar un mecanismo de adaptación para estabilizar esta hiperexcitabilización de la membrana del axón lesionado [72].

En el segmento proximal, los axones degeneran desde el lugar de la lesión hasta cierta distancia en dirección al soma neuronal (sobre uno o varios nódulos de Ranvier dependiendo de la magnitud de la lesión), en un proceso conocido como degeneración retrógrada. Durante este proceso, los axones se retraen proximalmente dejando atrás el compartimento endoneural como cilindros vacíos o tubos endoneurales [53].

Al cabo de unas horas, se produce una generación de una primera ola de brotes terminales y colaterales que degeneran rápidamente [73]. El tiempo necesario para que se lleve a cabo una estabilización citoesquelética estructural en los brotes definitivos se ha denominado “retraso inicial”.

El proceso de crecimiento axonal es complejo y variable, y en un mismo modelo de regeneración se demostró la presencia de proyecciones directas, laterales y arborizantes. La elongación de los axones se debe al avance de los conos de crecimiento, que desarrollan unas extensiones citoplasmáticas delgadas en forma cilíndrica que se estabilizan progresivamente por la polimerización de los microtúbulos donde la proteína de crecimiento asociada 43 (GAP-43) es clave

en su maduración [74]. Las CS junto con los tubos endoneurales juegan un papel fundamental en el proceso de guía de estos conos de crecimiento hacia el extremo distal. Cuando un cono de crecimiento entra en contacto con su objetivo, el axón aumenta de tamaño radialmente de forma progresiva [50] acompañado por una organización gradual del citoesqueleto [74].

En el extremo distal, tras la transección del nervio se inicia un proceso lento conocido como degeneración Walleriana o anterógrada. En este proceso, iniciado inmediatamente después de la lesión, se produce la desintegración de la mielina, la proliferación de CS y el reclutamiento de macrófagos [53]. Esto conduce a un proceso llamado desintegración granular del citoesqueleto axónico, que consiste en el desensamblaje de los microtúbulos, neurofilamentos y otros componentes estructurales provocando la fragmentación del axón [53].

Paralelamente, las CS se desdiferencian, proliferan a ambos lados y se distribuyen longitudinalmente formando las bandas de Büngner. Como los restos proteicos de mielina poseen un efecto inhibitor en los procesos de regeneración axonal, el reclutamiento de macrófagos es clave, ya que eliminan y reciclan todos estos componentes [50,75]. Además, los macrófagos pueden polarizarse hacia un fenotipo pro-regenerativo (M1) que contribuye a la regeneración axonal [75]. En caso de que las condiciones del microambiente sean favorables, los signos positivos de la regeneración nerviosa serán evidentes en el segmento distal (como abundantes FNP recién formadas, diferentes grados de mielinización y una adecuada reorganización de la MEC) [58]. Sin embargo, si se produce una denervación prolongada, tendrá lugar una respuesta fibrótica en el segmento nervioso distal [53].

2.2.2 Estrategias de reparación de los nervios periféricos

Antes de abordar las diferentes estrategias de reparación, se va a realizar una breve introducción sobre los distintos tipos y grados de lesiones en estos órganos. En la práctica clínica se pueden distinguir tres tipos de lesiones básicas: distensiones, laceraciones y compresiones. El éxito del proceso de reparación del nervio periférico depende en gran medida del grado de lesión y del momento en el que se lleve a cabo. Se han desarrollado sistemas de clasificación de lesiones clínicamente útiles que permiten correlacionar los cambios

microscópicos que se producen tras la lesión nerviosa y la sintomatología del paciente [76]. Uno de los sistemas de clasificación más aceptado fue el desarrollado por Sunderland [77] resumido en la tabla 1. Las lesiones están dispuestas en orden ascendente de gravedad del primer al quinto grado y afectan sucesivamente a (i) la conducción en el axón, (ii) la continuidad del axón. (iii) el tubo endoneuronal y su contenido, (iv) el funículo y su contenido, y finalmente (v) todo el tronco nervioso.

Tabla 1: Resumen de la clasificación de Sunderland para las lesiones de nervio periférico y su tratamiento recomendado.

Grado	Estructuras afectadas	Estructuras preservadas	Tratamiento
I	-	Parénquima y estroma	Conservativo
II	Fibras nerviosas	Capas estromales	Conservativo
III	Fibras nerviosas, endoneuro	Algunas capas estromales	Conservativo /Quirúrgico
IV	Parénquima y estroma	Epineuro	Quirúrgico
V	Parénquima y estroma	-	Quirúrgico

Las lesiones de primer grado son tipo más leve, no implica la pérdida de la continuidad nerviosa y provoca una pérdida funcional, que es transitoria. Se cree que la transitoriedad de este síntoma se debe a un bloqueo de la conducción local inducido por iones en el lugar de la lesión, aunque también se han encontrado sutiles alteraciones en la estructura de la mielina [78].

Las lesiones de segundo grado son aquellas que conllevan una interrupción completa del axón nervioso y de la mielina que lo rodea, mientras que las capas estromales circundantes se conservan. En este grado ya se produce la degeneración distal del axón y de la mielina explicada en secciones anteriores. Sin embargo, las perspectivas de recuperación son excelentes en este tipo de lesiones, ya que el entramado estromal restante proporciona una vía para que los axones germinados puedan reinervar al órgano diana.

Las lesiones de tercer grado implican la desconexión de un nervio. La pérdida funcional es completa y la recuperación sin intervención quirúrgica, no suele producirse debido a la formación de cicatrices y a la pérdida de la guía mesenquimal que dirige adecuadamente el rebrote axonal.

En las lesiones de cuarto y quinto grado se añade un daño estructural grave en las capas estromales, donde se conserva solo el epineuro o la rotura del tronco nervioso es total, respectivamente. Ambos tipos de lesión requieren de una reparación quirúrgica para su regeneración.

Teniendo en cuenta los distintos tipos de lesiones citadas, en este apartado se van a desarrollar las principales técnicas de reparación utilizadas a día de hoy en la práctica clínica: la reparación directa, el autoinjerto y el aloinjerto.

Reparación directa

La reparación directa o neurorrafia consiste en el restablecimiento de la continuidad nerviosa mediante la sutura epi o perineural de ambos extremos nerviosos. Es la técnica de reparación más efectiva y preferida en aquellos casos que no se haya producido una pérdida substancial de material nervioso. El procedimiento quirúrgico, debe realizarse siguiendo cuatro pasos: (i) disección y preparación de las terminaciones nerviosas, (ii) aproximación, (iii) coaptación y, finalmente, (iv) la sutura de las terminaciones nerviosas [78,79]. Asimismo, existen dos aspectos principales a tener en cuenta para aumentar las posibilidades de éxito en esta técnica, en primer lugar el nervio debe quedar libre de tensión tras la reparación, y en segundo lugar se debe de realizar un ajuste fascicular y vascular durante la reparación [12,80]. No obstante, en el caso de las lesiones traumáticas de mayor complejidad, ya sea por pérdida de una parte importante del segmento nervioso o por el impedimento de realizar una reparación libre de tensión, se recomienda el uso de injertos o substitutos nerviosos para reanudar la continuidad nerviosa [12,53,68,80].

Autoinjertos

El autoinjerto o injerto de nervio autólogo es el método de referencia actual para reparar los defectos nerviosos donde existe una pérdida substancial de tejido y

ha permanecido así durante los últimos 50 años [43,79]. Este injerto aporta una MEC específica enriquecida con CS viables y factores de crecimiento que no genera respuesta inmune, lo que favorece al proceso intrínseco de regeneración axonal. Estos injertos son principalmente sensitivos, debido a la no disponibilidad del uso de nervios motores [43,79]. Las diferencias entre los nervios nativos sensitivos y los motores hacen que se pueda causar algunos desajustes estructurales durante la reparación que afecten a la regeneración nerviosa y a la recuperación funcional [43,81,82]. Por este motivo, el autoinjerto nervioso ha demostrado una tasa de éxito no superior al 50% en los pacientes tratados [43,82]. Además, el autoinjerto de nervio tiene una serie de desventajas, entre las que se incluyen la prolongación del tiempo de la operación, la escasez de nervios prescindibles, el posible desajuste de tamaño, la pérdida de sensibilidad en la zona donante, la formación de neuromas y la cicatrización, debido a que se requiere una segunda intervención quirúrgica con las posibles infecciones asociadas. Por último, el uso del nervio autólogo está limitado a una distancia crítica de aproximadamente 5 cm de longitud y, más allá de esta distancia, se recomienda el uso de aloinjerto [33,43,79,83].

Aloinjertos

Los aloinjertos nerviosos proporcionan una MEC adecuada y en ocasiones células viables que podrían favorecer la regeneración nerviosa, en cambio producen una respuesta inmunitaria activa del huésped con un alto riesgo de rechazo del injerto [84]. El aloinjerto de donantes vivos tiene una longitud limitada, pero el aloinjerto cadavérico es una opción clínica alternativa en lesiones nerviosas graves o segmentarias [79,84,85]. Al igual que en todos los alotransplantes de órganos, para promover la regeneración axonal es necesaria una inmunosupresión sistémica de estos pacientes, con la contraindicación de una posible infección o incluso tumorigénesis [79,86]. En los últimos años, ciertos estudios han conseguido resultados satisfactorios con el uso de aloinjertos criopreservados sin tratamiento inmunosupresor [87], confirmando que una criopreservación adecuada reduce la inmunogenicidad de estos órganos, favoreciendo su uso experimental y clínico [88-90]. En los últimos años, la descelerización ha sido descrita como uno de los métodos más eficientes para la generación de andamios naturales a partir de tejidos nativos para diferentes

aplicaciones en IT. [47,91-93]. En consecuencia, nuevas alternativas terapéuticas generadas en el campo de la IT tales como la descelularización o la generación de bioconductos serán descritas en secciones posteriores.

3. Ingeniería Tisular del nervio periférico

Una vez descritas las limitaciones o desventajas que presentan las técnicas actuales en la reparación o sustitución de nervio periférico en la práctica clínica y conociendo las bases del proceso de regeneración nerviosa, la IT tiene como gran desafío el desarrollo de nuevos substitutos nerviosos alternativos que superen (o al menos igualen) los resultados proporcionados por el autoinjerto en lesiones severas donde la neurorrafia no puede aplicarse.

Para ello, es de vital importancia conocer en la mayoría de lo posible todos los elementos y mecanismos involucrados en el proceso de regeneración nerviosa, y en consecuencia buscar estrategias que utilicen la maquinaria celular y biomolecular de estos órganos para mejorar el crecimiento axonal a lo largo del injerto y promover la reinervación selectiva de la diana mejorando la recuperación funcional y reduciendo también los efectos indeseables. La secuencia de los principales procesos que suceden durante una regeneración axonal exitosa se resumen en la figura 3.

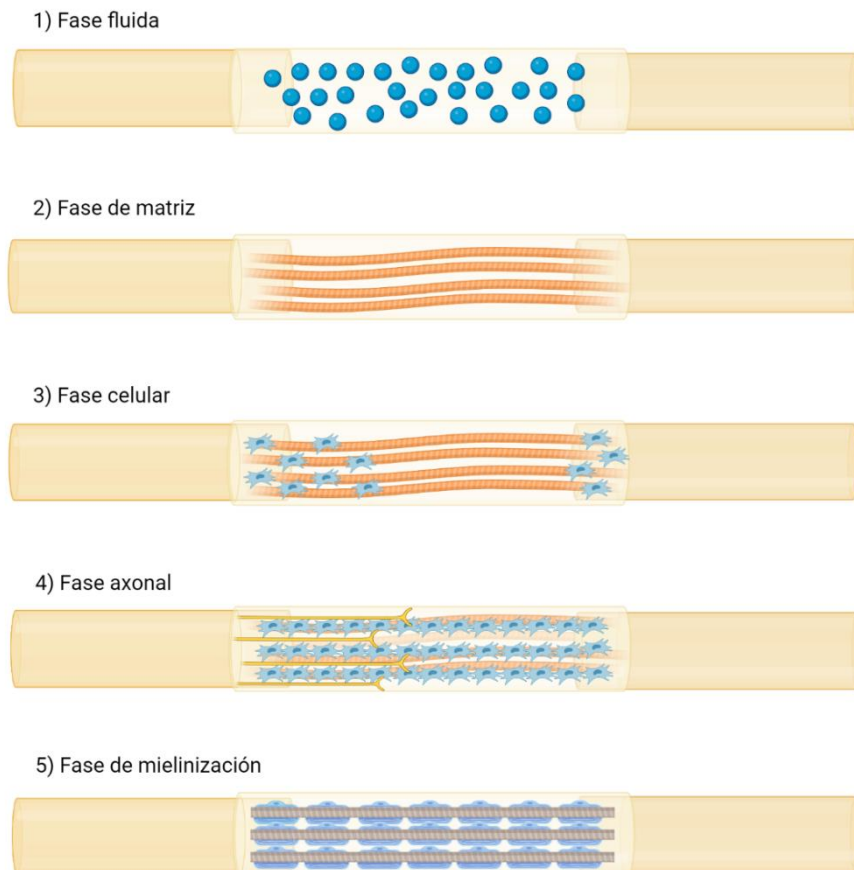


Figura 3: Secuencia regenerativa que ocurre dentro de un conducto nervioso hueco. Este proceso regenerativo se produce en cinco fases principales: 1) Fase fluida: el exudado plasmático llena el conducto, lo que provoca la acumulación de factores neurotróficos y moléculas de la MEC; 2) Fase de matriz: se forma un cable de fibrina acelular entre los extremos nerviosos proximal y distal; 3) Fase celular: Las células de Schwann, las células endoteliales y los fibroblastos migran (desde los muñones nerviosos proximales y distales), se alinean y proliferan a lo largo del cable de fibrina formando un cable de tejido biológico; 4) Fase axonal: los axones que vuelven a crecer utilizan este cable de tejido biológico para alcanzar sus objetivos distales; 5) Fase de mielinización: Las células de Schwann cambian a un fenotipo mielinizante y se asocian con los axones regenerados formando axones mielinizados maduros. Figura adaptada de Daly et al.(2012)[43] (elaborada en la aplicación en línea Biorender.com).

Por estas razones, la IT ha desarrollado durante los últimos 30 años diversas técnicas terapéuticas con el objetivo de generar un sustituto nervioso que posea las propiedades biomecánicas necesarias para ser implantado fácilmente y resistir los esfuerzos requeridos por el individuo, genere un microambiente que favorezca la regeneración axonal y proteja la zona afectada de otros procesos que interfieran o dificulten tal regeneración, como la infiltración de tejido fibrótico. En las secciones posteriores se describirán los principales métodos de generación de conductos nerviosos más utilizados en estudios preclínicos en la actualidad.

3.1 Descelularización

La descelularización ha emergido en los últimos años como un método de referencia en la IT para generación de biomateriales naturales a partir de tejidos nativos. Este método tiene por objetivo la generación de matrices biológicas tejido específicas no inmunogénicas, mediante la eliminación del contenido celular alterando en la menor manera posible la estructura y composición de las MEC resultantes. De este modo se resuelve el principal inconveniente del uso de injertos no autólogos, permitiendo la utilización de aloinjertos o incluso de xenoinjertos, ya que generalmente la composición molecular de la MEC está altamente conservada entre especies. Este hecho solventa uno de los principales inconvenientes del autoinjerto como es la disponibilidad de tejido específico en el momento de la reparación tisular, donde en muchos casos (como el nervio) es crucial para una buena regeneración funcional y evolución clínica [12,53]. Además, en comparación con el autoinjerto, el uso de aloinjertos

descelularizados eliminan la necesidad de una segunda intervención quirúrgica y de sus posibles complicaciones asociadas ya citadas anteriormente, como pérdida de sensibilidad, formación de neuromas, etc.

Sin embargo, no existe una técnica ideal de descelularización universal y por tanto en todo proceso de descelularización se produce cierto grado de alteración en el comportamiento químico, estructural o incluso biológico de la MEC resultante [47,93]. Por tanto, hay que tener en cuenta que multitud de variables como la densidad celular, la densidad de la matriz, el grosor y la morfología de la misma, pueden afectar a la efectividad de descelularización en los distintos tejidos y órganos y, por tanto, a la integridad estructural y bioquímica del andamio obtenido. De hecho, la incompleta descelularización del tejido puede retener restos celulares que pueden actuar de forma similar a las moléculas de patrón molecular asociadas a daño producidas tras una lesión tisular que reclutan a células del sistema inmunológico del huésped, produciendo una respuesta inflamatoria intensa que puede mitigar o inhibir completamente el proceso de regeneración en el tejido [94].

El proceso de descelularización de cada órgano o tejido de interés requiere tratamientos específicos, cuidadosamente diseñados que preserven las características bioquímicas asociadas a cada tipo de tejido para estimular el proceso de regeneración tras ser implantados [92].

A lo largo de las últimas décadas, se han generado varios ANDs con resultados prometedores [95-98], llegando uno, incluso a ser aprobado por la FDA para su uso en la práctica clínica, como es el caso de Axogen[®], [79].

En las siguientes secciones se va a describir brevemente los distintos tipos de descelularización que se utilizan actualmente según su naturaleza física, química o biológica; haciendo hincapié en los métodos que eliminan o conservan las biomoléculas que juegan un papel clave en el proceso de regeneración axonal en las lesiones de nervio periférico.

3.1.1 Tipos de descelularización

Métodos Físicos

Este tipo de métodos se han utilizado con el fin de provocar la lisis celular mediante diferentes mecanismos físicos (ciclos de congelación/ descongelación, sonicación) o como complemento de otros métodos para ayudar a retirar los restos celulares (agitación/inmersión o aplicación de gradientes de presión) [47].

Numerosos estudios han utilizado múltiples ciclos de congelación y descongelación como método para la interrupción celular irreversible a partir de la generación repetida de cristales de hielo intracelulares [90,99]. Esta técnica puede minimizar las cantidades de agentes químicos necesarios para una descelularización eficaz. Se ha demostrado que los ciclos de congelación-descongelación no alteran significativamente las propiedades mecánicas de la MEC [100,101] aunque sí producen alteraciones en la ultraestructura del tejido. Para minimizar los efectos adversos en la arquitectura del tejido manteniendo la lisis celular, se ha sugerido el uso de un crioprotector como la trehalosa al 5% [102]. Las células se dañan irreversiblemente con estos métodos, pero aún no se remueven de la MEC de los tejidos y órganos. Los restos celulares pueden permanecer atrapados en la MEC y provocarán la activación de las CS, los macrófagos y otras células inflamatorias pudiendo conducir un retraso en la regeneración del tejido o incluso al rechazo del aloinjerto [103]. Por esta razón, los ciclos de congelación y descongelación no son considerados un método de descelularización, sino más bien una inactivación [40].

La sonicación consiste en la aplicación de ultrasonidos para agitar las partículas de los tejidos u órganos con tal intensidad que produzca la rotura de la membrana celular. Este método ha sido ampliamente utilizado en varios órganos [104,105] y recientemente en nervio periférico con resultados muy prometedores [106].

Métodos Químicos

A pesar que el método químico más ampliamente utilizado es el uso de detergentes, existen otras estrategias que han demostrado su eficiencia en la descelularización, tales como soluciones hipertónicas o hipotónicas, ácidas o básicas, sustancias quelantes y alcoholes.

Es bien conocido, que el uso de detergentes es la estrategia más eficiente para eliminar los restos celulares durante la descelularización [98]. Según su naturaleza química, los detergentes se dividen en no iónicos, iónicos y zwitteriónicos.

Los detergentes no iónicos actúan disolviendo las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína respetando en cierta medida las interacciones proteína-proteína y la actividad enzimática. [47,107]. El Tritón X-100 es el detergente no iónico más utilizado, obteniendo resultados satisfactorios en varios órganos [47] y en nervio concretamente [96].

Los detergentes iónicos actúan principalmente en las interacciones proteína-proteína pudiendo desnaturalizarlas y alterar completamente las membranas celulares [98]. El dodecil sulfato de sodio (SDS), el desoxicolato de sodio (SDC) y el Tritón X-200 se encuentran entre los agentes de descelularización iónicos más utilizados debido a su eficiencia en la solubilización de las membranas citoplasmáticas, los lípidos y el ADN [47]. Sin embargo, hay que destacar que el Tritón X-200 ha sido retirado del mercado, por lo que se deben de buscar alternativas a su uso. El SDS ha demostrado tener un nivel de efectividad de eliminación de glucosaminoglicanos (GAG) similar a la enzima condroitinasa ABC [108], que en el caso del nervio es beneficioso para su regeneración tras implante [109].

Los detergentes zwitteriónicos o anfóteros poseen propiedades de los detergentes iónicos y no iónicos. Estos detergentes presentan menos eficiencia en la eliminación de contenido celular que los detergentes iónicos, en cambio presentan una mejor preservación de su ultraestructura [40]. Los más utilizados de este grupo son: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), sulfobetaína-10 (SB-10) y SB-16 [93]. El SB-10 y el SB-16 muestran una mayor preservación de la MEC y una mejor eliminación de células que los detergentes no iónicos [110], y el CHAPS preserva mejor el colágeno, glicosaminoglicanos y elastina que el detergente iónico SDS [111,112], al tiempo que elimina el 95% del material nuclear.

Otro método ampliamente utilizado es la inmersión en soluciones hipotónicas o hipertónicas, causando un choque osmótico en las células y facilitando la eliminación de material celular del tejido mediante la disociación del ADN de las proteínas [113]. No obstante, el uso único de soluciones hipo e hipertónicas no suelen ser suficientes para la obtención de materiales acelulares.

Además, las soluciones con un pH extremo pueden aumentar la eficacia de eliminación celular pero pueden ocasionar daños substanciales en los componentes de la MEC. Las soluciones alcalinas, desnaturalizan eficazmente el ADN plasmídico y cromosomal. Las soluciones más utilizadas en descelularización han sido el hidróxido de amonio, el sulfuro de sodio, hidróxido de sodio e hidróxido de calcio [47]. Por otro lado, las soluciones ácidas son usadas para separar el ADN de la MEC a través de la solubilización de los componentes citoplasmáticos y la rotura de los ácidos nucleicos. Es importante de optimizar la concentración y el tiempo de exposición durante el proceso de descelularización ya que pueden desnaturalizarse proteínas de la MEC tales como fibras colágenas, GAGs y factores de crecimiento [47]. Los ácidos comúnmente utilizados para la descelularización incluyen el ácido desoxicólico y el ácido acético. Sin embargo, se ha demostrado que este último causa daños y elimina los colágenos de la MEC, con una reducción de la resistencia de los substitutos [114].

Por último, los alcoholes pueden producir un lisado de las células por deshidratación, en el caso que hayan sido previamente permeabilizadas, [115,116]. Una estrategia común para eliminar los ácidos nucleicos residuales del tejido descelularizado es un lavado final con etanol o metanol, aunque hay que tener en consideración que la cadena de carbono apolar de los alcoholes disuelve sustancias no polares como los lípidos. Sin embargo, Levy et al. demostraron que el pretratamiento con etanol de los tejidos altera la estructura del colágeno mediante la reticulación de la MEC [117]. Además, altas concentraciones de etanol para descelularizar pueden ejercer como agente entrecruzante modificando las propiedades físicas de los substitutos acelulares [118].

Métodos Biológicos

Los agentes enzimáticos incluyen nucleasas (por ejemplo, ADNasa, ARNasa), proteasas (por ejemplo, tripsina, dispasas) y esterases (fosfolipasa A2) y su utilización es muy recomendable debido a su especificidad de sustrato biológico, lo que le permite eliminarlos sin un impacto en los demás componentes del tejido en cuestión.

Las nucleasas, como la ADNasa y ARNasa, son endonucleasas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster fragmentando las secuencias de ácidos nucleicos [93,113]. En general, estas enzimas suelen añadirse al proceso si no se consigue una descelularización efectiva con el mero uso de los detergentes [119,120]. Varios estudios han obtenido buenos resultados en la generación de aloinjertos descelularizados de NP con Triton X-100 [97,121] o SDS [108,122] en combinación con nucleasas. En referencia a las proteasas, la tripsina rompe selectivamente las proteínas celulares adherentes en el sitio carboxilo de los aminoácidos arginina o lisina, con el fin de despegar las células de la superficie del tejido. La tripsina se ha mostrado como un adyuvante eficaz durante la descelularización, aunque tiempos prolongados de incubación en esta enzima daña el colágeno presente en la MEC. [123,124]. La dispasa II es una proteasa bacteriana que escinde selectivamente la fibronectina y el colágeno IV de la membrana basal, y se utiliza para separar las láminas epiteliales del sustrato [34,125]. La dispasa II se utiliza en los pasos iniciales de la descelularización de muchos tejidos, incluyendo la piel porcina y las córneas, pero requiere un tratamiento posterior con otros agentes para lograr una descelularización adecuada [123,126]. Asimismo, la esterasa fosfolipasa 2 puede hidrolizar los componentes fosfolipídicos de tejidos tales como la córnea, preservando los proteoglicanos y la ultraestructura colágena aunque puede afectar al contenido de GAGs [127,128].

Durante el proceso de descelularización se pueden liberar diferentes proteasas de las células lisadas que por un lado pueden inhibir la acción de las enzimas utilizadas durante la descelularización [47] y por otro causando daños estructurales en el tejido en cuestión [40]. Para minimizar este daño, a veces se añaden al protocolo de descelularización inhibidores de proteasas como la aprotinina, la leupeptina o el fluoruro de fenilmetilsulfonilo [47].

Con todo esto, es importante destacar que los protocolos de descelularización suelen combinar diversas estrategias (físicas, químicas y enzimáticas) para descelularizar de forma efectiva alterando de la menor manera posible la MEC restante según las características intrínsecas de los tejidos u órganos en cuestión. Por otro lado, no hay que olvidar que no solo es importante el tipo de agente descelularizante que utilicemos en cada caso, sino también la concentración/intensidad y tiempo de exposición en cada solución juegan un papel importante en todo el proceso.

3.2 Conductos bioartificiales

La fabricación de conductos utilizados en la reparación nerviosa se remonta a la década de 1880, donde a Gluck y colaboradores crearon un tubo de hueso descalcificado para facilitar la aproximación de las terminaciones nerviosas transectadas [129]. Este acoplamiento de las terminaciones nerviosas dentro del dispositivo tubular compensaba la falta de instrumentación adecuada en una época anterior a la aparición de la microcirugía [130]. La fabricación de sustitutos nerviosos presentó un avance discreto hasta la publicación histórico trabajo de Dahlin y Lundborg al inicio del siglo XXI utilizando tubos de silicona [131]. Su trabajo no solo estudió la aplicación de los tubos en la reparación de nervios periféricos sino que también (y quizá lo más importante) caracterizó el mecanismo de acción de la regeneración dentro del lumen del conducto [130]. El conducto funciona encerrando los extremos distales y proximales del nervio dentro del lumen proporcionando una alineación bruta del nervio y la contención del líquido axoplásmico que se escapa de los extremos del nervio seccionado. Esta contención de los extremos nerviosos y de los fluidos que emanan de los mismos permite el inicio del proceso de regeneración (explicado con detalle en la figura 3) que tiene por objetivo alcanzar la recuperación de la continuidad axonal.

En resumen, el conducto nervioso debe de cumplir una serie de requisitos como: ser biocompatible, tener suficiente resistencia y flexibilidad sin presionar el nervio, aislar el axón regenerado del tejido cicatricial, tener baja inmunogenicidad con buena adhesión celular en la dirección requerida, y tener un tiempo de degradación apropiado, cuyos productos de degradación sean no tóxicos [130,132,133]. El diseño del conducto nervioso puede consistir en un único tubo

hueco no poroso con/sin material de relleno o un conducto nervioso multicanal para imitar la estructura nativa del tejido nervioso [133]. Dependiendo de la naturaleza del sustituto nervioso generado (natural, sintético o combinado), la IT ha desarrollado en los últimos años diferentes técnicas de fabricación tales como: moldeo por inmersión [134,135], sustitutos multilaminares [36], fundición con disolvente y lixiviación de partículas [136], hidrogeles intraluminales celulares o acelulares [33,74], electrospinning [137], crosslinking [138], trenzado y bioimpresión [139].

Desde la generación de los primeros conductos nerviosos usando elastómero de silicona (no degradable y biológicamente inerte), se han utilizado una amplia gama de biomateriales en los últimos 20 años, que según su naturaleza los podemos clasificar en naturales o sintéticos.

Los biomateriales naturales utilizados para la generación conductos nerviosos se pueden clasificar en dos categorías principales: (I) materiales provenientes de tejidos neuronales o no neuronales de origen alo o xenogénico, principalmente usados en forma de hidrogel [140,141]; (II) polímeros de origen natural, incluyendo moléculas de la MEC (colágeno, laminina, fibrina, fibronectina y hialuronano), otros polisacáridos (quitosano, alginato, agarosa) y proteínas (fibroína de seda, queratina) [36,52,142].

Más recientemente, diferentes clases de polímeros sintéticos biodegradables, tales como los poliésteres ácidos poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA), poliláctico coglicólico (PLGA), policaprolactona (PCL) y sus copolímeros, han sido ampliamente utilizados debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas, así como sus propiedades termoplásticas permitiendo su fabricación con cualquier forma deseada [132,143,144].

Entre los productos comercializados aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA), o por la Unión Europea, se encuentran conductos fabricados a base de productos naturales (generalmente colágeno tipo I) Neurotube® NeuroGen®, NeuroFlex™, NeuroMax™, NeuroWrap™ y NeuroMend™; y por otro lado los fabricados con los polímeros sintéticos PGA y PLC, Neurotube® y Neurolac®, respectivamente [79,145]

Tabla 2: Comparación de las características principales de las alternativas utilizadas en la reparación de lesiones nerviosas periféricas. Tabla adaptada de Bauback Safa y Gregory Buncke (2016) [130].

Revisión de los beneficios de cada tipo de material			
Propiedades	Conducto artificial	Aloinjerto descelularizado	Autoinjerto nervioso
Biocompatible	+	+	+
MEC específica	-	+	+
Andamio endoneural	-	+	+
Células de Schwann/soporte	-	-	+/-
Laminina	-	+	+
Factores de crecimiento	-	+	+
Vascularidad/andamio vascular	-	+/-	+
Biomecánica similar a nervio	+/-	+	+
Estéril	+	+	+

3.3 Funcionalización de los substitutos nerviosos generados.

Los recientes avances en el campo de la IT han cambiado el concepto de andamio pasivo, que simplemente proporcionaba un espacio protegido para la regeneración nerviosa, por un modelo de entorno activo, que busca promover el crecimiento neuronal y acelerar la regeneración axonal [52]. Para ello, la identificación de moléculas y estrategias específicas que puedan promover la reparación de los nervios sigue siendo un gran desafío [146]. Esta búsqueda es especialmente importante en el caso de las lesiones graves (> 2 cm), en las que el uso de conductos nerviosos por sí solo no ha conseguido una regeneración satisfactoria [52].

3.3.1 Crosslinkers o agentes entrecruzantes

Una manera eficiente de mejorar las propiedades biomecánicas y la estabilidad estructural de matrices acelulares o conformadas por biopolímeros naturales es mediante el uso de agentes entrecruzantes o *crosslinkers* químicos [147].

Estos agentes pueden inducir, en determinadas circunstancias, interacciones covalentes inter o intramoleculares entre las moléculas de la MEC o los

biomateriales [148]. En la ingeniería de tejidos, se han utilizado varios agentes químicos siendo el glutaraldehído uno de los más utilizados para este fin. Sin embargo, a pesar de su aceptable eficacia, una serie de desventajas limitan su uso como la citotoxicidad, la baja biocompatibilidad *in vivo*, la calcificación distrófica, la fijación del tejido y el crecimiento celular subóptimos [32,149-151].

En los últimos años se han testado una gran cantidad de agentes químicos como crosslinkers para mejorar las propiedades biomecánicas de diferentes biomateriales. Algunos de los utilizados en matrices de colágeno son el dehidrotermal y la carbodiimida (EDAC) presentando una mejora en la estabilidad estructural con mejores resultados de biocompatibilidad que el glutaraldehído [152]. Otros agentes utilizados para el crosslinking de quitosano en ingeniería tisular neural son el fosfato de sodio dibásico [153] y el EDAC [154].

Sin embargo, en los últimos años, el GP, un glucósido iridoide natural, extraído y purificado de la *Gardenia Jasminoides*, ha surgido como alternativa al glutaraldehído [155]. Este agente se ha utilizado con éxito en el entrecruzamiento de biomateriales (quitosano, colágeno, fibrina-agarosa, etc.) y en la aplicación en MECs descelularizadas (pericárdico, válvulas cardíacas, córnea, médula espinal, vasos sanguíneos, etc.) [30,156-161] con una evidente mejora de las propiedades biomecánicas y una mejor biocompatibilidad y propiedades biológicas que el glutaraldehído [30,151,155,162,163]. Además, existen estudios que sugieren que el GP ejerce unas propiedades antiinflamatorias notables en los materiales [164-166]. Por todo esto, el GP está siendo usado en la ingeniería tisular neural, entrecruzando conductos de quitosano [167,168], colágeno/quitosano [166], gelatinas [169] e incluso hidrogel de MEC acelular derivada de cordón umbilical [161].

No obstante, la presente Tesis Doctoral incluye el primer estudio del efecto del GP en aloinjertos de nervio periférico descelularizados en cuanto a sus propiedades histológicas, biomecánicas y de biocompatibilidad se refiere [170].

3.3.2 Células

Una gran esperanza en el campo de la medicina regenerativa para la reparación de nervios es la explotación del potencial regenerativo de las terapias basadas en células. Las CS, las células madre neurales, las células madre embrionarias

y las células mesenquimales de la médula y grasa han sido las células de soporte más estudiadas [52], aunque recientemente las células de la mucosa olfativa (CMO) están captando interés. Las CMO se desarrollan a partir de un origen periférico, el placo olfativo, y conservan la capacidad de autorrenovación y diferenciación, y se consideran células progenitoras nerviosas periféricas [171,172].

A pesar del papel fundamental que pueden jugar las CS en la regeneración en los diferentes sustitutos nerviosos, el uso de este tipo celular presenta ciertos inconvenientes. En primer lugar, las CS autólogas son difíciles de obtener en gran número, tienen un bajo rango de división y en segundo lugar CS alogénicas están implicadas en los rechazos inmunológicos por parte del huésped [52]. Por tanto, la aplicación de células madre de fuentes alternativas en el campo IT nerviosa ha despertado mucho interés. En concreto las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) y las derivadas de la grasa (ADSC) debido a que su uso no plantea problemas éticos, fácil extracción, rápida proliferación, y tienen la capacidad de diferenciarse a lo largo de múltiples líneas celulares, en particular a los linajes de células neurales y gliales asociadas [173-176].

Tanto las ADSC como las BMSC tienen la ventaja de mostrar la capacidad de secretar múltiples factores neurotróficos, incluyendo el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), neurotrofina de factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-3 y factor neurotrófico derivado del cerebro [177-179] que juegan un papel importante en la supervivencia, el mantenimiento y la regeneración de poblaciones neuronales específicas [180]. Estas células se han utilizado en varios estudios, tanto en estado diferenciado como indiferenciado, para investigar su efecto en la regeneración de los nervios periféricos con resultados prometedores [52].

3.3.3 Biomoléculas

En los esfuerzos por mejorar la regeneración funcional de los nervios, se han hecho avances en la creación de un entorno más apropiado para favorecer el proceso de reparación a lo largo del injerto. Las estrategias incluyen el uso de

factores de crecimiento exógenos, factores neurotróficos, laminina u péptidos de adhesión de cadena corta.

Existen suficientes evidencias científicas sobre los diferentes impactos positivos en la reconstrucción de los nervios generados según el sistema de liberación de sustancias utilizado [181], lo que ha dado lugar a la necesidad de mejorar estos sistemas. Existen varias estrategias clásicas para la liberación continua de factores de crecimiento en los substitutos nerviosos, como la adsorción de factores de crecimiento a la superficie y/o al interior de una matriz, la incorporación de factores de crecimiento a los materiales durante su fabricación, la inclusión de microesferas cargadas de factores de crecimiento y la inmovilización covalente de dichos factores en la MEC.

Los factores neurotróficos mejoran la regeneración funcional, apoyando el crecimiento axonal, la migración y la proliferación de las CS, y aumentando la neuroprotección a través de la activación de vías de señalización intrínsecas específicas mediada por el receptor [182]. Estos factores neurotróficos pertenecen principalmente a tres familias distintas (i) las neurotrofinas; (ii) los ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de las células gliales (GFL); y (iii) las citoquinas neuropoyéticas [183]. Cada familia tiene características funcionales distintas con algunas respuestas celulares que se solapan [183]. Las neurotrofinas incluyen el NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro, la neurotrofina-3 y la neurotrofina-4 [184]; los GFL incluyen el factor neurotrófico derivado de células gliales, y las citoquinas neuropoyéticas incluyen el factor neurotrófico ciliar [183]. Estos factores neurotróficos se han utilizado solos o en combinación para aprovechar la respuesta más eficaz para la regeneración del nervio periférico [169,185-187].

Además, también se ha demostrado la eficacia del uso de otros factores de crecimiento como suplemento a los substitutos nerviosos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) [43,188]. Por otro lado, existen varios estudios que han optado por la funcionalización de los diferentes bioconductos con la proteína basal laminina, debido a su importancia en la regeneración nerviosa, con resultados prometedores [189,190].

Por último, la modificación de la química de los biomateriales es otra alternativa que puede optimizar el comportamiento celular con secuencias peptídicas cortas, como por ejemplo, RGD, que facilitan la adhesión celular a la superficie de los polímeros [191] y se han utilizado en la generación de conductos nerviosos con resultados muy destacables [192-194].

IV HIPÓTESIS

La complejidad estructural de los NP es muy difícil de reproducir en laboratorio, lo cual obliga a desarrollar nuevos métodos y técnicas de biofabricación. La generación y evaluación de nuevos sustitutos de nervio periférico a partir de la descelularización, emerge como alternativa prometedora en el tratamiento de lesiones estructurales neurales. Si bien, diversos ANDs han sido descritos, los resultados experimentales, y principalmente clínicos, son controvertidos. Por esta razón, el desarrollo de protocolos de descelularización tisular más eficientes es fundamental.

En este contexto, la generación de nuevos ANDs con propiedades biológicas, moleculares, inmunológicas y estructurales mejoradas podrían promover una rápida y más eficiente regeneración tisular y recuperación funcional que las técnicas actualmente disponibles.

En este sentido la presente Tesis Doctoral aspira por un lado a estudiar nuevas estrategias para obtener sustitutos descelularizados con propiedades biomecánicas mejoradas mediante crosslinking químico, y, por otro lado, a la generación y optimización de nuevos protocolos de descelularización que intenten mejorar los ya descritos. Esto podría suponer un avance importante en el campo de la generación de biomateriales para diversas aplicaciones biomédicas, así como en lo que respecta el tratamiento quirúrgico, mediante ingeniería tisular, de lesiones estructurales de NP.

V OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto de tesis doctoral es elaborar, mediante nuevos procesos de descelularización tisular y crosslinking químico, aloinjertos de nervio descelularizados (ANDs) para el tratamiento de lesiones estructurales de nervio periférico.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar nuevos protocolos de descelularización tisular, utilizando agentes químicos y/o biológicos, y combinarlos con protocolos de entrecruzamiento químico para la generación de nuevos ANDs para la reparación de nervios periféricos.
2. Determinar, *ex vivo*, el grado de descelularización tisular, preservación de la matriz extracelular y las propiedades biomecánicas, biológicas y de biocompatibilidad de los ANDs generados.
3. Evaluar a nivel preclínico la eficacia terapéutica de los nuevos ANDs generados en un modelo animal de lesión y reparación de nervio periférico, y determinar el perfil de recuperación funcional y regeneración tisular mediante protocolos de evaluación clínica, funcional e histológica.
4. Correlacionar los resultados *ex vivo* e *in vivo* obtenidos con los nuevos ANDs generados, para determinar su potencial traslación clínica para el tratamiento de lesiones estructurales de nervio periférico.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de aloinjertos nerviosos descelularizados funcionalizados con genipín

1.1 Obtención de nervios y proceso de descelularización

Las muestras de NP se obtuvieron de 35 ratas Wistar adultas de 12 semanas de edad. Los animales se mantuvieron durante todo el estudio en la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (España). Para obtener los nervios ciáticos, los animales fueron anestesiados profundamente mediante una inyección intraperitoneal de acepromazina (Calmo-Neosan® 0,001 mg/g), ketamina (Imalgene 1000® 0,15 mg/g) y atropina (0,05 µg/g) y eutanasiados con solución Eutanex®. Posteriormente, se extrajeron ~3 cm de ambos nervios ciáticos (n=70 nervios de 3 cm cada uno) y se criopreservaron en 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) en suero bovino fetal (SBF) a -80°C hasta su uso. Se descongelaron 60 NP a temperatura ambiente (TA), se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1M (pH = 7), se seccionaron en segmentos de 1 cm y se asignaron aleatoriamente a las técnicas de descelularización Sondell (SD) o Roosens (RS). Se hicieron excepciones para las pruebas biomecánicas (véase la sección correspondiente).

Brevemente, para generar los segmentos de ANDs obtenidos mediante el método de Sondell (SD-ANDs) se trataron de la siguiente manera: I) agua destilada durante 7 horas; II) 3% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Alemania) durante la noche (ON, 16-18 horas); III) 4% desoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich) durante 24 horas. Se repitió todo el procedimiento y a continuación los nervios se lavaron abundantemente en agua destilada y se conservaron en PBS a 4°C hasta su uso posterior. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente y con agitación constante (24 rpm) [195].

Para la generación de RS-ANDs se realizaron los siguientes procedimientos I) inmersión en tampón Tris 50 mM (pH = 8) a 4°C ON con agitación constante (igual que SD); II) tratamiento con Tritón X-100 al 1% (diluido en el mismo tampón) a 4°C durante 24 horas; III) lavado en solución salina tamponada de Hank (HBSS); IV) dos tratamientos consecutivos con una solución de digestión enzimática [100 mg/L de ADNasa (Sigma-Aldrich), 20 mg/L de RNAsa (Sigma-

Aldrich) y 100 mg/L de tripsina (Sigma-Aldrich) en HBSS] a 37°C durante 45 minutos y bajo agitación constante; V) Tritón X-100 al 1% en tampón Tris 50 mM a 4°C ON con agitación constante; VI) varios lavados en HBSS. Los ANDs se mantuvieron en HBSS a 4°C hasta su uso [98,196]. Por último, los SD-ANDs se lavaron varias veces en agua destilada, mientras que la HBSS se utilizó para lavar y almacenar los RS-ANDs.

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa española y europea de experimentación animal (directiva de la UE nº 63/2010, RD 53/2013). Además, este estudio fue aprobado por el comité ético local (nº FIS PI20/0318).

1.2 Entrecruzamiento químico con genipín

Un total de 120 AND fueron sometidos a entrecruzamiento química con GP al 0,10% y al 0,25% (m/v) diluida en PBS (0,1 M a pH 7,2-7,4) como se ha descrito previamente [30]. Brevemente, 10 trozos de ANDs de 1 cm se sumergieron en un mínimo de 50 ml de soluciones de GP durante 72 horas a 37°C protegiéndolos de la luz. Tras este periodo, los ANDs entrecruzados se lavaron varias veces durante 48h con PBS y se mantuvieron en esta solución a 4°C hasta los análisis posteriores. Finalmente, los grupos experimentales se definieron en función del método de descelerización (SD o RS) y de la concentración de la solución de GP utilizada (GP 0,10% o GP 0,25%). Además, se utilizaron como controles los AND de SD y RS, así como nervio ciático nativo. Los grupos (n=30 para cada uno) se abreviaron de la siguiente forma:

- Grupo control SD (SD-CTR)
- Grupo SD entrecruzado con solución de GP al 0,10% (SD-GP 0,10%)
- Grupo SD entrecruzado con solución de GP al 0,25% (SD-GP 0,25%)
- Grupo control RS (RS-CTR)
- Grupo RS entrecruzado con solución de GP al 0,10% (RS-GP 0,10%)
- Grupo RS entrecruzado con solución de GP al 0,25% (RS-GP 0,25%)
- Grupo control nativo (NAT)

1.3 Caracterización histológica y ultraestructural

Las muestras de nervios periféricos de todos los grupos experimentales y de los controles (n=3) se fijaron durante 48 horas a temperatura ambiente en una solución de formalina neutra tamponada al 4%p/v. Posteriormente se lavaron, se deshidrataron, se limpiaron y finalmente se incluyeron transversalmente en parafina [197]. Los tejidos embebidos en parafina se cortaron a 5 µm de grosor, se hidrataron y se sometieron a una completa caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica siguiendo recomendaciones previamente descritas [40].

Con el objetivo de evaluar la morfología general e identificar los núcleos celulares, las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Además, se utilizó el fluorocromo intercalante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para identificar los restos de ADNs (interacciones A-T) mediante microscopía de fluorescencia. Por otro lado, para determinar la presencia y distribución de los restos de la vaina de mielina y de la red de colágeno fibrilar, se tiñeron las secciones con el método histoquímico MCOLL, tal como se ha descrito previamente [197,198]. La MEC se evaluó con los métodos histoquímicos de Azul Alcian (AB) y Picrosirius (PS) para determinar los glicosaminoglicanos ácidos (GAG) y los colágenos fibrilares, respectivamente. Por último, se determinó la presencia de la glicoproteína de la membrana basal, Laminina, mediante inmunohistoquímica indirecta.

Con el fin de confirmar la eliminación de las células y sus principales componentes, se estudió mediante inmunohistoquímica la distribución de las proteínas citoesqueléticas neurofilamento (NFL, axones neuronales) y vimentina (VIM, fibroblastos y CS), así como la proteína S- 100 (CS). Los anticuerpos utilizados y los detalles técnicos del procedimiento inmunohistoquímico se resumen en la Tabla 3.

Caracterización ultraestructural

Por otro lado, para llevar a cabo la caracterización ultraestructural, las muestras de NP de todos los grupos experimentales y del control se fijaron en 2,5% de glutaraldehído en tampón de cacodilato 0,05 M (pH 7,2) a 4°C durante la noche,

y luego se lavaron, al menos tres veces, en el mismo tampón a 4°C. A continuación, para preservar la mielina, las muestras se post-fijaron durante 1 hora con OsO₄ al 2%. Las muestras fijadas se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% y 100%), y se secaron completamente utilizando el método de secado del punto crítico [30]. Las muestras secadas se cubrieron con oro y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío (FEI Europe, Países Bajos) del Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

Análisis histológico cuantitativo

Además, se realizó un análisis cuantitativo para evaluar el impacto de los distintos protocolos de descelularización en dos componentes fundamentales de la MEC, como son los GAG y las fibras de colágeno. Para ello en este estudio, el compartimento endoneural, esencial para promover la regeneración del nervio, fue sometido a análisis histológicos cuantitativos mediante la determinación del porcentaje de área (fracción de área) ocupada por la MEC teñida mediante los métodos histoquímicos AB y PS, respectivamente [74,95]. Para ello, se utilizaron secciones histológicas de cada condición experimental teñidas con tinción AB y PS, pero sin contrastes (n=3 para cada grupo). Las tinciones se fotografiaron bajo los mismos parámetros de luz, apertura y exposición con un microscopio Nikon Eclipse Ti 90 equipado con una cámara digital Nikon DS-Ri2.

Brevemente, las imágenes histológicas se procesaron con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para seleccionar las reacciones histoquímicas positivas de PS y AB (función de canal de división de color). Posteriormente, las imágenes se convirtieron en formato binario y luego se calculó automáticamente la fracción de área (en 20 áreas de 7785,44 μ²/imagen) mediante la función de medida del software. Los valores de la fracción de área proporcionan información cuantitativa sobre la densidad de los componentes de la MEC dentro de los ANDs.

Tabla 3: Anticuerpos y reactivos utilizados para los análisis inmunohistoquímicos.

Anticuerpo/reactivo	Dilución / Incubación	Tratamiento previo	Referencia
Anticuerpo policlonal de conejo anti-S100 (Z0311)	1:400 ON a 4°C	Tampón citrato pH = 6 30 min a 95°C	DakoCytomation. Dinamarca (Z0311)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-neurofilamento	1:500 1h a RT	Tampón EDTA pH = 8 25 min a 95°C	Sigma-Aldrich. Alemania (RMdO20)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- vimentina V9	1:200 1h a RT	Tampón citrato pH = 6 25 min a 95°C	Sigma-Aldrich. EE.UU. (V6630)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-laminina	1:200 Pasar la noche a 4°C	Tampón citrato pH = 6 25 min a 95°C	Abcam. Reino Unido (ab11575)
Anticuerpo monoclonal de conejo anti-GAP-43	1:400 ON a 4°C	Tampón citrato pH = 6 25 min a 95°C	Abcam. Reino Unido (ab75810)
ImmPRESS® HRP Anti-Mouse IgG (Peroxidasa)	Listo para usar 30 min a RT	-	Laboratorios Vector. EEUU (MP-7402)
ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidasa)	Listo para usar 30 min a RT	-	Laboratorios Vector. EEUU (MP-7401)
Cromógeno: Kit de diaminobenzidina listo para usar	-	-	Laboratorios Vector. EEUU (SK-4100)
Contraste: Hematoxilina de Harris	30 segundos	-	Thermo Scientific (6765004)

1.4 Determinación del contenido de ADN remanente

Para confirmar que las muestras están correctamente descelularizadas, y cumplen los requisitos de <50 ng de ADN/mg de peso seco de tejido [40,113], se extrajo y cuantifico el contenido de ADN total de cada muestra (correspondiente a cada grupo experimental y control) (n=5). Para ello se utilizó el kit QIAamp ADN (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además, el ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Para estos análisis se realizaron cinco lecturas técnicas por muestra. Por último, los resultados del ADN total se normalizaron con respecto al peso seco de cada muestra.

1.5 Caracterización biomecánica

Para determinar el impacto de la técnica de descelularización y el entrecruzamiento del GP, los NPs fueron sometidos a ensayos de tracción con el objetivo de calcular la tensión, deformación y extensión a la fractura, así como el módulo de Young o viscoelástico (porción lineal inicial), tal y como se ha descrito previamente [36,40,98]. Los ensayos de tracción se realizaron con una máquina de ensayos electromecánicos de materiales (Instron, Modelo 5943) con el software Bluehill 3.62 y una célula de carga de 50 N. Para estos ensayos, se colocaron cuatro muestras de cada condición (segmentos de ~3 cm de longitud) entre las mordazas del instrumento dejando una distancia constante de 1 cm [36]. Estos ensayos se realizaron con una velocidad de deformación constante de 10 mm/min y un valor de precarga de 5×10^{-3} N a temperatura ambiente. Los datos se trazaron como curvas de tensión-deformación, y se calcularon los distintos parámetros anteriormente mencionados.

1.6 Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo* (interacción célula-biomaterial)

Para estudiar la biocompatibilidad de los ANDs generados, se evaluó la interacción de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo de rata (rADSC) con estas matrices acelulares. El perfil de indiferenciación de estas células se caracterizó mediante inmunohistoquímica y citometría, expresando positividad para los marcadores CD90 = 96,27% y CD29 = 98,72%, y negatividad para CD45 = 98,87%, como ha sido descrito previamente [30,199].

En primer lugar, para asegurar que las células se adhiriesen a los ANDs generados en lugar de a la superficie de los pocillos de la placa de cultivo celular Costar® de 24 pocillos (Corning, EE.UU.), se recubrieron con 300 µl de agarosa tipo I esterilizada al 3,5% (m/v) (Sigma-Aldrich) en PBS. A continuación, se abrieron longitudinalmente segmentos de ANDs de 5 mm de longitud, se colocaron en los pocillos recubiertos de agarosa y, en la superficie del interior de

cada muestra (compartimento endoneural) se sembraron 2×10^4 rADSC (pase IV-VI). Posteriormente los pocillos se suplementaron con medio de cultivo basal *Dolbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con un 10% de SBF y una solución comercial de antibióticos y antimicóticos al 1% (todos los productos de Sigma Aldrich) y se mantuvieron durante 48 horas en condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% de CO₂). Finalmente, se determinaron las interacciones célula-biomaterial mediante el ensayo WST-1 (Laboratorios Roche, Suiza), *Live/Dead® Cell Viability Assay* (L/D) (Thermo-Fisher Scientific, EE.UU.), y la cuantificación del ADN liberado, tal y como se ha descrito y recomendado previamente [21,32,98] [40].

Brevemente, en el L/D las muestras con células y los controles se incubaron con la solución de trabajo compuesta por calceína/homodímero de etidio-1 durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron con PBS y se tomaron imágenes de fluorescencia con un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con una cámara digital Nikon DXM 1200c (Nikon, Japón) mostrando las células viables y metabólicamente activas en color verde, y las células muertas en color rojo, ya que permitieron que el agente intercalante etidio entrara al núcleo. Por otro lado, la actividad metabólica celular de las rADSC sembradas en los diferentes ANDs generados se midió cuantitativamente con el ensayo de la sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1). Tras ser incubadas con el reactivo de la solución de trabajo durante 4 h a 37 °C, se midió la reacción colorimétrica en su pico máximo a 450 nm, con un espectrofotómetro (ASYS UVM340) y el software DigiRead (Biocrom Ltd., Reino Unido).

En todos los ensayos, se utilizaron como control negativo los ANDs colocados en pocillos recubiertos previamente con agarosa tipo I y suplementados con medio de cultivo basal, pero sin células sembradas encima. Además, se sembraron 2×10^4 rADSCs en pocillos sin recubrimiento de agarosa y se utilizaron como controles técnicos positivos o negativos 2D. En el caso del control negativo 2D, se indujo un daño irreversible de la membrana celular y de los núcleos utilizando Tritón X-100 al 2%. Todos estos ensayos se realizaron por quintuplicado.

1.7 Análisis estadísticos

En este estudio, todos los datos cuantitativos se recogieron y analizaron con el programa informático SPSS v24. En primer lugar, todas las variables se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Como las variables mostraban una distribución no normal, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis post-hoc por grupos realizado con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. En este sentido, se consideraron estadísticamente significativas los valores de $p < 0,05$.

2. Optimización de un nuevo método de descelularización para nervio periférico

2.1 Diseño y generación de nuevos métodos de descelularización neural

Para la generación de sustitutos nerviosos descelularizados se obtuvieron nervios ciáticos de 35 ratas Wistar adultas de 12 semanas de edad siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.1 de materiales y métodos de la presente Tesis Doctoral. Se extrajeron ~3 cm de ambos nervios ciáticos (n=70 nervios) y se criopreservaron en 10% de DMSO en SBF a -80 °C hasta su uso, como se ha descrito anteriormente.

Un total de 60 NP fueron descongelados a temperatura ambiente, lavados en agua destilada, seccionados en fragmentos de 1 cm de longitud (excepto los utilizados en el ensayo biomecánico ~3 cm) y distribuidos aleatoriamente en los diferentes grupos de descelularización. En este estudio, se desarrollaron tres nuevos protocolos de descelularización (P1, P2 y P3), que se caracterizaron y compararon con el método clásico de descelularización de SD [195] y nervios nativos utilizados como control (NAT).

Los protocolos de descelularización cuentan con varios pasos y cada uno tiene una duración de 24 horas, a menos que se especifique lo contrario. Además, después de cada paso, las muestras se lavaron tres veces con agua destilada. Los principales pasos de cada protocolo probado fueron los siguientes:

- Protocolo de descelularización 1 (P1): agua destilada, 0,6% de Tritón X-100, 0,1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 1% de desoxicolato de sodio (SDC) y dos tratamientos consecutivos de una solución de mezcla enzimática (100 mg/L de ADNasa (DN25) y 20 mg/L de ARNasa en PMS 0,1 M) durante dos ciclos de 1h.
- Protocolo de descelularización 2 (P2): agua destilada, 3% Tritón X-100, 1% SDS, 4% SDC y solución de mezcla enzimática durante dos ciclos de 1h.

- Protocolo de descelularización 3 (P3): mismo procedimiento que P2 sustituyendo la solución de mezcla enzimática por 4h de ácido peracético (PAA) al 3%.
- Grupo de control SD: dos ciclos de Tritón X-100 al 3% y SDC al 4% alternativamente, 24 horas en cada paso.

Cuando se completó la descelularización, los nervios de cada procedimiento se lavaron abundantemente en agua destilada y se mantuvieron en PBS a 4°C hasta su posterior uso. Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación constante (24 rpm). Los nervios nativos fueron descongelados para utilizarlos como grupo control. Todos los reactivos utilizados se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

2.2 Caracterización histológica y estructural

Las muestras de nervios nativos y descelularizados de todos los grupos experimentales (n=3) fueron sometidas a una completa caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica como fue recomendado previamente [40]. Los métodos histológicos y ultraestructurales utilizados en este estudio fueron los mismos que se describen en el apartado 1.3 de materiales y métodos de la presente Tesis Doctoral.

Conjuntamente al análisis realizado mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB), en este estudio se añadió la caracterización ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En este caso, las muestras (n=3) fueron fijadas y postfijadas en tetróxido de ósmio siguiendo el mismo procedimiento que para la MEB. A continuación, para el MET las muestras se deshidrataron en gradientes ascendentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 95% y 100%) y se procesaron para incluirlas en la mezcla de resina de Glauerts, tal como se ha descrito previamente [106]. A continuación, se obtuvieron secciones ultrafinas de 70 nm utilizando un ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se recogieron en una rejilla recubierta de pioloformo. Al día siguiente, los especímenes fueron teñidos con una solución de reemplazo de acetato de uranilo (Electron Microscopy Sciences Hatfield, PA, USA) y analizados mediante un microscopio electrónico de

transmisión JEM-1010 (JEOL, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Megaview-III y un Soft-Imaging-System (SIS, Münster, Alemania) [106,200].

Esta evaluación ultraestructural permite determinar la eliminación efectiva de la mielina y los restos celulares, así como la correcta conservación de los principales componentes de la MEC.

Análisis histológico cuantitativo

Además, en el caso de la cuantificación histológica, en este estudio no solo se analizó el compartimento endoneural, sino que además se analizó el compartimento perifascicular (que incluye el epineuro y el perineuro). Concretamente, en este estudio se analizó cada región seleccionando el área total teñida por el umbral de color en HSB (tono, saturación, brillo) con el software ImageJ. El cálculo de la intensidad de la parte externa se realizó comparando la media de la intensidad HSB de todos los píxeles coloreados de las regiones de interés en cada grupo descelularizado, normalizando con el grupo control nativo en los dos métodos histológicos utilizados. Además, el compartimento endoneural, esencial para promover la regeneración del nervio, fue sometido a análisis histológicos cuantitativos para determinar el porcentaje de área ocupada por el colágeno restante o los proteoglicanos de la MEC (tinción PS y AB respectivamente)[74,95].

2.3 Análisis bioquímicos de la matriz extracelular resultante

El ADN total se extrajo y purificó de las muestras de tejido utilizando el kit QIAamp ADN Mini como ha sido descrito en apartados previos. Para la cuantificación de los sGAG, se utilizó el ensayo *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan* (Biocolor, Reino Unido) según el protocolo del fabricante y luego se analizó la reacción colorimétrica, en su pico máximo a 656 nm, con un espectrofotómetro (ASYS UVM340) y el software DigiRead. Los valores de ADN y sGAGs se normalizaron con el peso seco de las muestras de tejido antes de la extracción (n=5 cada técnica).

2.4 Caracterización biomecánica y transparencia

Para evaluar el impacto de los diferentes protocolos de descelularización utilizados en las propiedades físicas de los ANDs obtenidos, los nervios periféricos fueron sometidos a un ensayo de transparencia y otro de tracción.

La transparencia se determinó utilizando imágenes macroscópicas de los nervios nativos y de los ANDs. Brevemente, los nervios se colocaron sobre un fondo blanco y negro (n=5) y las imágenes se analizaron posteriormente con el software *ImageJ*. Se midió la intensidad en cinco puntos diferentes de cada nervio para el área blanca y negra como se ha descrito previamente [98,201]. Se calcularon los valores medios, y la diferencia entre el área blanca y negra del nervio se expresó como porcentaje de la diferencia máxima entre el fondo blanco y negro. Así, los porcentajes bajos corresponden a nervios menos transparentes, mientras que los porcentajes altos indican niveles altos de transparencia del nervio, donde el fondo negro es observable a través de la muestra.

Por otro lado, las propiedades biomecánicas de los diferentes ANDs generados se evaluaron siguiendo la metodología descrita previamente en el apartado 1.5 de la presente Tesis Doctoral.

2.5 Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo* (interacción célula-biomaterial)

Con el fin de determinar la biocompatibilidad de los ANDs generados, se evaluó la interacción de las rADSC con estas matrices acelulares, tal y como se describió previamente [170]. Para ello, se siguieron los pasos descritos en el apartado 1.6 de materiales y métodos de la presente Tesis Doctoral.

3. Estudios preclínicos de los nuevos aloinjertos descelularizados en el modelo de lesión de nervio ciático de ratas:

3.1 Procedimientos quirúrgicos y grupos de estudio experimentales

En primer lugar, se anestesió profundamente a los animales mediante una inyección intraperitoneal de acepromazina (Calmo-Neosan® 0,001 mg/g), ketamina (Imalgene 1000® 0,15 mg/g) y atropina (0,05 µg/g). A continuación, en 24 animales se cosechó cuidadosamente un segmento de 1 cm del nervio ciático izquierdo, dejando el nervio ciático derecho como control no operado [42,95]. Los animales fueron asignados aleatoriamente (n=6 por grupo) para ser reparados con los ANDs caracterizados previamente (SD, P1 y P2) y el grupo de autoinjerto (AUTO), en el que el defecto del nervio crítico fue reconectado con el nervio extirpado pero girado 180°. Además, se mantuvo un grupo control no operado (CTR) (n=3) durante todo el experimento.

3.2 Evaluación *in vivo* de los sustitutos nerviosos descelularizados para la reparación del nervio periférico

3.2.1 Evaluación clínico-funcional

Los animales de todos los grupos experimentales fueron sometidos a una evaluación clínica, sensitiva y de recuperación motora.

Clínicamente, se registró la presencia o ausencia de amputaciones (falta de dedos) en las patas operadas y se expresó en porcentaje. Además, los animales fueron sometidos a un análisis de recuperación de la función sensitiva y motora después de 15 semanas, siguiendo protocolos previamente descritos y recomendados en la literatura [33,95,96,202,203].

Con el objetivo de evaluar la recuperación de la función sensorial se realizó la prueba de presión (*Pinch test*). Ésta prueba consiste en aplicar un leve estímulo mecánico (presión o pinchazo) en la piel de la extremidad posterior izquierda, en la zona comprendida entre los dedos del pie hasta la articulación de la rodilla, hasta que se observa una respuesta refleja (reacción de retirada). La respuesta se calificó de 0 a 3: 0 = sin respuesta de refleja, 1 = respuesta al estímulo por

encima del tobillo, 2 = respuesta a la estimulación distal al tobillo en la región del talón/plantar, y 3 = respuesta a la estimulación en la región metatarsal [33,95].

Por otro lado, para evaluar la recuperación funcional motora: se aplicó la prueba del índice funcional ciático (SFI). Para ello se evaluó la huella de la marcha, tal como se ha descrito anteriormente [204]. Brevemente, las regiones plantares de ambos pies se tiñeron con tinta azul, y los animales se introdujeron en un dispositivo de Plexiglas® (1 m de longitud, 10 cm de ancho y 15 cm de altura) cubierto con papel [33,42,95], donde se registraron las huellas. En estas huellas, se midieron los siguientes parámetros: (1) la longitud de la huella (PL), siendo la distancia desde el talón hasta el tercer dedo; (2) la separación de los dedos (TS), que es la distancia desde el primer al cuarto dedo; y (3) la separación de los dedos intermedios (ITS), que es la distancia desde el segundo al cuarto dedo. Estos datos se utilizaron para calcular el SFI siguiendo la siguiente fórmula $SFI = -38,3 \times PL + 109,5 \times TS + 13,3 \times ITS - 8,8$. Hay que tener en cuenta que en cinco animales no fue posible determinar el SFI (grupo AUTO (1), grupo SD (2), grupos P1 y P2 (1 cada uno)) debido a la existencia de amputaciones.

Para la prueba de extensión de los dedos del pie (*Toe Spread Test*), como indicador de la recuperación motora, se levantaron a los animales por la cola y se evaluó la reacción de abducción y extensión de los dedos del pie. Los resultados se calificaron de 0 a 3: 0 = sin movimiento de los dedos, 1 = algún signo de movimiento de los dedos, 2 = abducción de los dedos y 3 = abducción de los dedos con extensión [33,42].

3.2.2 Análisis hematológicos y serológicos

Para estos análisis, se recolectó 1,5 ml de sangre de cada animal en tubos Eppendorf® heparinizados como se ha descrito previamente [95,205,206]. Brevemente, el análisis de recuento hematológico se realizó con un analizador automático Sysmex KX-21 N (EE.UU.). Para los análisis serológicos, el suero se obtuvo por centrifugación a 3.500 rpm durante 15 minutos y, a continuación, se realizaron determinaciones serológicas cuantitativas con un equipo Cobas c311 y kits bioquímicos siguiendo las recomendaciones del fabricante (Laboratorios Roche). Los parámetros hematológicos y serológicos analizados fueron el recuento de glóbulos rojos (RBC), la hemoglobina (HGB), el volumen corpuscular

medio (MCV), el recuento de glóbulos blancos (WBC), los linfocitos (LYM), el recuento de células mixtas (MXD), los neutrófilos (NEUT) y el volumen medio de plaquetas (MPV). Los parámetros bioquímicos evaluados fueron la alanina transaminasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST), la bilirrubina total (BILT), la creatinina (CRE), la urea (UREA), el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDLC), el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDLC), triglicéridos (TRIGL), amilasa (AMYL), creatina quinasa (CK), hierro (IRON) y glucosa (GLUC). Además, cuando fue posible, los valores registrados se compararon con el rango estándar hematológico descrito en el estudio de *Kampfmann et al.* [207].

3.3. Estudios post-mortem

Una vez realizadas las evaluaciones clínicas y funcionales, los animales fueron anestesiados profundamente y se obtuvieron ambos nervios ciáticos (operados y sanos). A continuación, una vez confirmado el sacrificio, se obtuvieron ambas patas desarticulando las articulaciones de la rodilla y el tobillo. Las muestras recolectadas se fijaron en solución de formol al 4% durante 48 horas a temperatura ambiente, excepto la porción adyacente distal (0,5 cm) del injerto nervioso implantado, que se aisló y fijó durante 24 horas en glutaraldehído al 2,5% para realizar análisis de MET y morfométricos. Todas las muestras se procesaron en consecuencia para los análisis posteriores.

3.3.1 Evaluación morfométrica muscular

Después de 24 horas de fijación en formol al 10%, las secciones de las piernas completas obtenidas fueron sometidas al cálculo del peso húmedo. A continuación, se diseccionaron cuidadosamente los músculos *gastrocnemius* y *tibialis anterior* de ambas extremidades, la sana y la operada, dejándolos en formol al 10% otras 24 horas. A continuación, se midió el peso húmedo de cada músculo de forma independiente. El porcentaje de pérdida de peso se calculó en cada animal como $[(\text{músculo del lado de la lesión/lado contralateral}) * 100] - 100$ [42,95,208].

3.3.2 Análisis histológico y estructural

Tras la fijación de los nervios ciáticos, se aisló la porción correspondiente al injerto implantado y se cortó transversalmente en tres partes (proximal, medial y distal). El procesamiento y la obtención de las secciones histológicas de los nervios operados y control se realizaron como ha descrito previamente en la sección 1.3 de material y métodos de la presente Tesis Doctoral. La morfología general se evaluó mediante la tinción de HE, y el grado de remielinización así como la organización del colágeno, se evaluaron mediante MCOLL [42,95,201]. Además, la regeneración de la NP fue confirmada por inmunohistoquímica indirecta para S-100, el marcador celular de Schwann y NFL que marca los axones maduros regenerados. Los detalles técnicos de los procedimientos inmunohistoquímicos y los anticuerpos utilizados se resumen en la Tabla 3.

3.3.3 Análisis histomorfométrico y ultraestructural

En este caso las muestras utilizadas fueron las adyacentes distales del injerto, para comprobar el grado de regeneración final que ha conseguido cruzar el injerto. Estas muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, se post-fijaron en OsO_4 , y se incluyeron en la mezcla de resina de Glauerts como se ha descrito previamente en la sección 2.1 de materiales y métodos de la Presente Tesis doctoral.

Para el análisis cuantitativo de la morfometría se obtuvieron secciones transversales de 2,5 μm de grosor y se tiñeron con una tinción de azul de toluidina al 1% con el objetivo de realizar un examen microscópico de alta resolución y una estereología (análisis cuantitativo de las fibras nerviosas), utilizando el microscopio DM4000B, equipado con una cámara digital DFC320 (Leica Microsystems) y el procesamiento de imágenes mediante Image-J. Se analizaron tres muestras teñidas al azar de cada grupo, se midió el área transversal total de todo el nervio a nivel de microscopía óptica y se seleccionaron 15-25 campos de muestreo a 100X utilizando el protocolo de muestreo aleatorio sistemático y el criterio de exclusión descritos previamente [106,209]. La densidad media de fibras se calculó dividiendo el número total de fibras nerviosas (N) dentro del campo de muestreo por su área (N/mm^2). El número total de fibras (N) se estimó finalmente multiplicando la densidad media

de fibras por el área total de la sección transversal del nervio. Además, se midió el área de la fibra y del axón y el diámetro de se calculó el diámetro la fibra (D) y del axón. Estos datos se utilizaron para calcular el grosor de la mielina $[(D-d)/2]$, y la relación diámetro del axón/fibra, la *g-ratio* (D/d).

La evaluación ultraestructural de la regeneración del nervio se realizó seleccionando tres muestras al azar de cada grupo y obteniendo imágenes representativas como se ha descrito previamente en la sección 2.1 de materiales y métodos de la Presente Tesis doctoral.

VII RESULTADOS

1 Generación de aloinjertos nerviosos descelularizados funcionalizados con genipín

1.1 Caracterización histológica y estructural

En cuanto a la caracterización histológica de los AND generados, los análisis de HE revelaron que la estructura histológica general de las NP estaba relativamente bien conservada tras la descelularización y posterior entrecruzamiento con GP (Fig. 4.A). Los nervios nativos (utilizados como control) mostraron su organización estromal característica con compartimentos epineurales, perineurales y endoneurales bien organizados. Tras los procesos de descelularización SD y RS, se observaron algunos cambios estructurales. En el caso de los grupos SD, la tinción HE mostró una clara alteración del compartimento endoneural, especialmente con el uso de GP, pero las capas de tejido conectivo perifascicular estaban menos afectadas (Fig. 4.A). El análisis de los grupos de RS reveló una mejor conservación del compartimento endoneural con una capa perineural bien definida y el tejido conectivo epineural circundante. No se observaron diferencias con el uso de GP, excepto el color de fondo azul debido a la acción del 0,25% de GP. En relación con la conservación de los núcleos, la tinción con HE y especialmente con DAPI no reveló la presencia de núcleos bien conservados, pero se encontraron algunos restos de ADN especialmente en el grupo SD (Fig. 4.B).

La mielina y la red de colágeno circundante se evaluaron mediante el método histoquímico MCOLL. Esta técnica confirmó una mielinización característica y abundante, además del contenido de colágeno bien delineado en los nervios sanos (Fig. 4.C). No se observó ninguna reacción histoquímica positiva para la mielina en los grupos SD, pero este método reveló una fina red de colágeno endoneural. Curiosamente, se percibió cierta positividad para la mielina en los grupos RS. La mielina se observó inmersa en una MEC endoneural de colágeno bien conservada en RS-CTR. La reacción de la mielina fue ligeramente más evidente en los grupos RS-GP, donde la ECM de colágeno estaba menos organizada (Fig. 4.C).

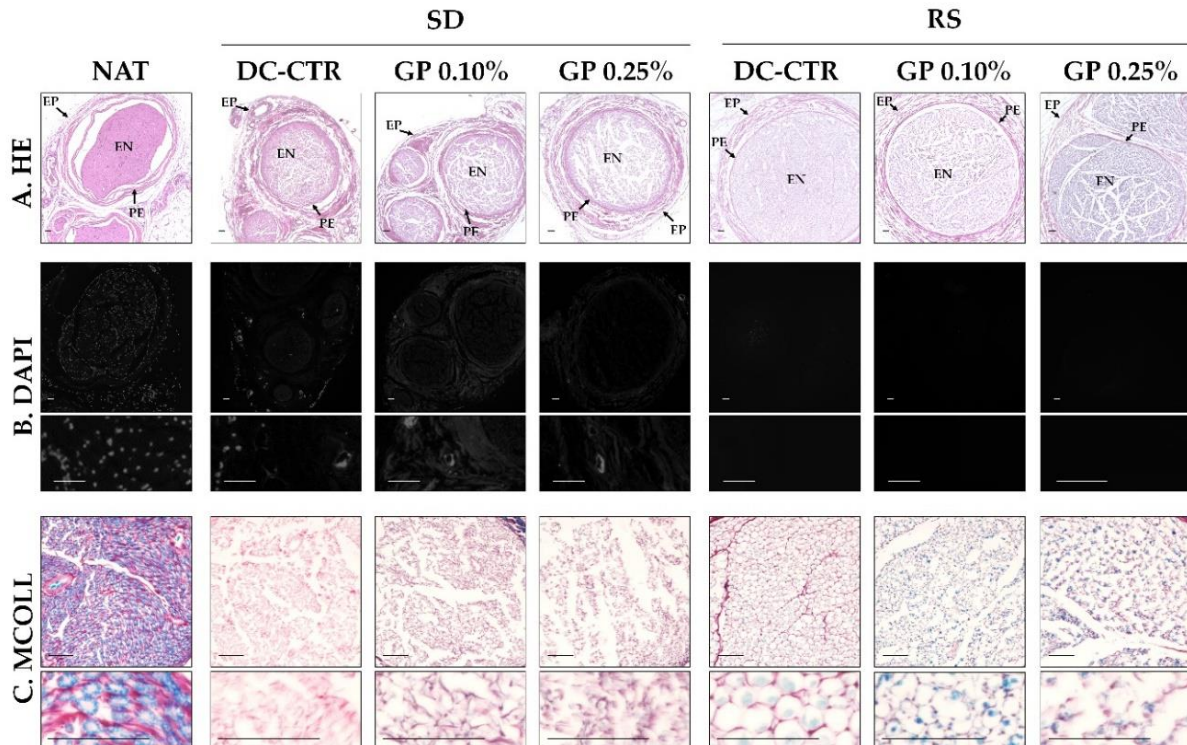


Figura 4: Microscopía de luz y fluorescente de los nativos y de los AND. A) Secciones teñidas con Hematoxilina Eosina o HE. (Nótese que se indican los compartimentos epineural (EP), perineural, (PE) y endoneural (EN). B) Imágenes de microscopía fluorescente de nervios teñidos con DAPI que reconoce las interacciones A-T del ADN. C) Secciones teñidas con el método histoquímico MCOLL que tiñe la mielina en azul claro y las fibras de colágeno en rojo. Barra de escala = 100µm.

Los análisis ultraestructurales por MEB mostraron la estructura densa y altamente compacta del compartimento endoneural en los nervios nativos. Esta técnica demostró que el método de SD era capaz de eliminar los restos de mielina de los NPs dejando unos tubos endoneurales irregulares y poco estructurados (Fig. 5). Además, el uso de GP, especialmente al 0,25%, mejoró la estructura y la homogeneidad de los tubos endoneurales restantes (Fig. 5). En el caso de los AND generados con el método de RS, el MEB confirmó la conservación de los tubos endoneurales rellenos de restos irregulares de mielina. La definición de estas estructuras mejoró con el uso de GP sin que hubiera diferencias entre las concentraciones de GP utilizadas. Por otra parte, la evaluación por MEB no permitió determinar si los axones, las células u otro componente celular persistían tras la descelerización y el posterior entrecruzamiento con GP (Fig. 5).

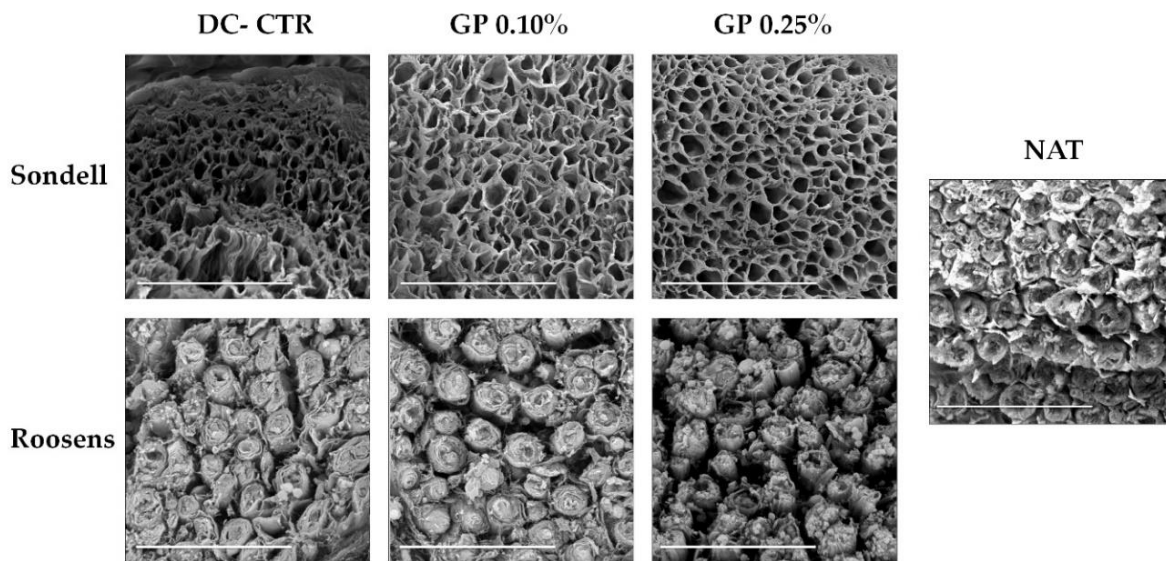


Figura 5: Microscopía electrónica de barrido de los nativos y de los AND. Obsérvese la organización tridimensional de la MEC remanente en los AND, que en el caso de los grupos SD fue posible identificar los tubos endoneurales), especialmente después del entrecruzamiento químico con GP. En el caso de los grupos RS, esta técnica confirmó la presencia de restos de mielina en el compartimento endoneural). Barra de escala = 10 μ m.

Para determinar si algunos remanentes de proteínas celulares persistían después de la descelularización se realizó inmunohistoquímica para las proteínas S-100, NFL y vimentina (Fig. 6). La reacción positiva para estas proteínas se encontró con la distribución típica en los nervios nativos. Cuando se evaluaron estas proteínas en los AND y en los AND entrecruzados con GP, no se observaron reacciones inmunohistoquímicas para las CS (S-100 y vimentina), los axones (NFL) y los fibroblastos (vimentina), excepto en el grupo RS-CTR, donde se observó una reacción débil e irregularmente distribuida para S-100 (Fig. 6).

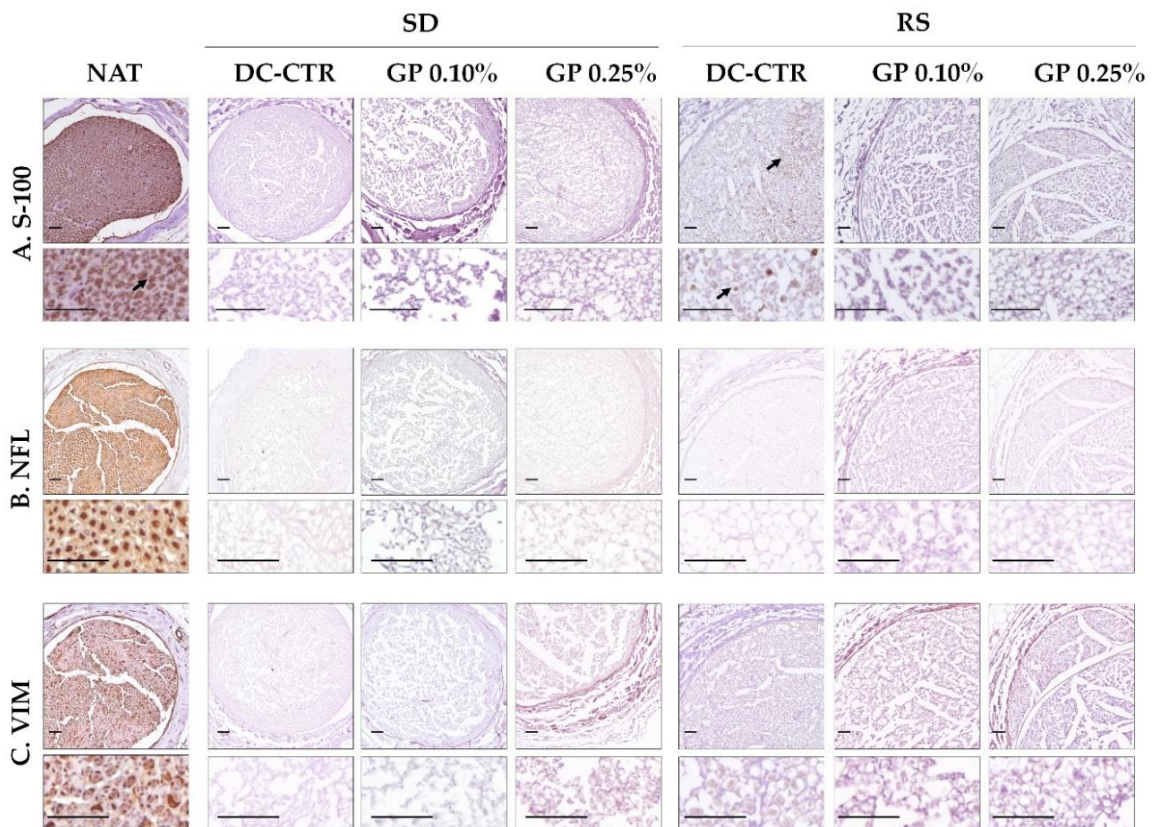


Figura 6: Evaluación inmunohistoquímica de los restos de proteínas celulares y citoesqueléticas en los AND. Estos análisis confirmaron la eficiente eliminación de los componentes celulares evaluados (S-100, neurofilamento (NFL) y vimentina (VIM)) tras la descellularización de las NP. Obsérvese que en el grupo RS persiste una ligera reacción positiva a la S-100 (indicada con flechas negras). El patrón inmunohistoquímico típico para cada marcador se pudo observar en los nervios nativos utilizados como control (NAT). Barra de escala = 200 μ m.

Para evaluar la conservación de los componentes de la MEC, se realizaron ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos. La tinción AB (Fig. 7.A) mostró la presencia de proteoglicanos ácidos a nivel intrafascicular en los nervios nativos. Estas moléculas de MEC no fibrilares se eliminaron eficazmente de todas las capas histológicas con el método de SD, sin que hubiera diferencias histoquímicas tras el entrecruzamiento con GP. En relación con los grupos de RS, la tinción AB mostró una preservación parcial de estas moléculas, estando especialmente bien definidas en el perineuro (Fig. 7.A). Curiosamente, en los grupos RS-GP se observó una disminución de la distribución de la reacción histoquímica AB (Fig. 7.A). Estos hallazgos fueron corroborados por el análisis cuantitativo del área ocupada por la reacción histoquímica AB a nivel endoneural

(Fig. 8). En este contexto, todos los AND mostraron valores de fracción de área para AB significativamente menores en comparación con la condición nativa ($p < 0,05$). Además, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos SD-CTR y RS-CTR ($p = 0,13$). Curiosamente, los valores de la fracción de área de AB de SD-GP 0,10% fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de los grupos SD-CTR y SD-GP 0,25% (Fig. 8).

Por el contrario, el uso de ambas concentraciones de GP dentro de los RS-AND dio lugar a una disminución significativa de los valores de la fracción de área AB en comparación con el grupo RS-CTR ($p < 0,05$; Fig. 8).

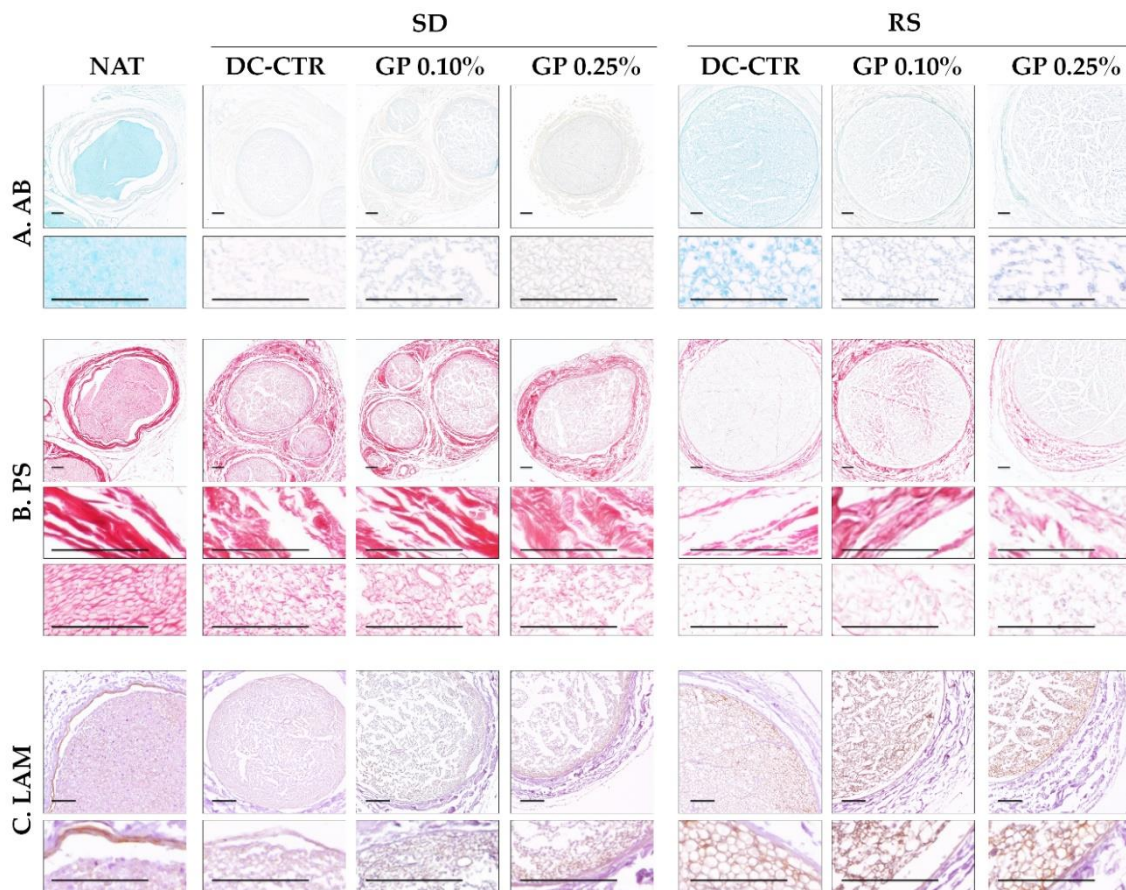


Figura 7: Análisis histoquímico e inmunohistoquímico de las moléculas de la MEC que permanecen en los AND. A) Se muestra la reacción histoquímica positiva de los proteoglicanos ácidos (azul claro) por el método histoquímico del azul Alcian. B) Identificación histoquímica de los colágenos fibrilares en rojo mediante el método histoquímico Picrosirius. C) Identificación inmunohistoquímica de la glicoproteína laminina que reveló la membrana basal de Fslas fibras PN o los tubos endoneurales (reacción positiva de color marrón), que estaban bien conservados en los grupos RS. Barra de escala = 100 μ m.

Cuando se analizó la red tridimensional de colágeno mediante tinción con PS, se observó una conservación relativamente buena de estas fibras tras ambos procedimientos de descelularización (Fig. 7.B). En los grupos SD, la MEC de colágeno epi y perineural (perifascicular) perdió organización estructural y compactación, mientras que se conservó moderadamente bien a nivel endoneural. La evaluación de los grupos RS-CTR y RS-GP mostró una disminución de la reacción histoquímica de PS en todos los compartimentos histológicos (Fig. 7.B). A pesar de esta disminución, la tinción mediante PS reveló la conservación de tubos endoneurales de colágeno bien definidos en los grupos RS-CTR y especialmente RS-GP (Fig. 7.B). Estos resultados fueron aclarados por los valores de la fracción de área de PS (Fig. 8). Sorprendentemente, no se observaron diferencias estadísticas entre los nervios nativos y el grupo SD-CTR. Por otra parte, los grupos SD-GP, RS-CTR y RS-GP presentaron valores de fracción de área de PS significativamente menores que la condición nativa ($p < 0,05$; Fig. 8). La disminución de los valores de la fracción de área de PS obtenida con el uso de ambas concentraciones de GP en comparación con SD-CTR fue significativa ($p < 0,05$), pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RS-CTR y RS-GP ($p > 0,05$; Fig. 8)

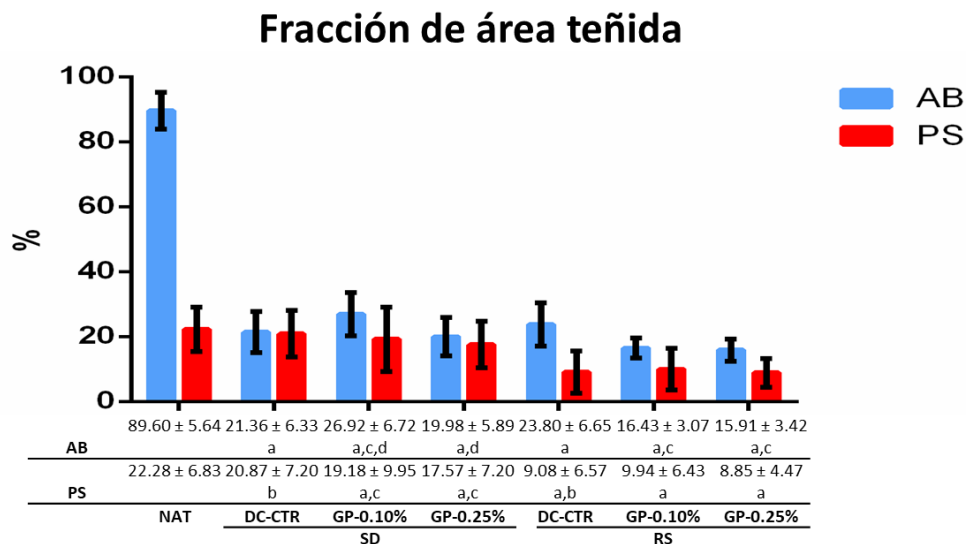


Figura 8: Análisis histoquímicos cuantitativos de las tinciones con azul Alcian (AB) y Picrosirius (PS) en el nervio nativo y los AND. Representación gráfica y numérica de los valores medios de la fracción de área \pm valores de desviación estándar (barras de error) correspondientes a cada reacción histoquímica positiva/área histológica en cada condición experimental y nervios nativos utilizados como control (NAT). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney y se representaron de la siguiente manera: a= diferencias estadísticamente significativas frente al grupo NAT. b=

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SD- CTR frente a RS-CTR. c= diferencias estadísticamente significativas frente a su correspondiente grupo DC-CTR. d= diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de GP 0,10% frente a GP 0,25% utilizada en cada condición descelularizada (SD o RS).

Por último, el análisis inmunohistoquímico de la laminina confirmó la conservación de esta glicoproteína de la lámina basal que delimita los tubos endoneurales en los grupos de RS, sin que el tratamiento con GP tuviera ningún impacto sobre estas reacciones. Curiosamente, no se observaron reacciones inmunohistoquímicas para la laminina en los grupos SD-CTR y SD-GP (Fig. 7).

1.2 Determinación del contenido de ADN remanente

La extracción de ADN de todos los grupos descelularizados se resume en la Fig. 9. La cuantificación del ADN extraído mostró una pérdida significativa en todos los grupos descelularizados en comparación con el grupo nativo. Comparando ambos métodos descelularizados, el ADN extraído en el grupo RS-CTR fue significativamente menor que en el grupo SD-CTR ($p < 0,05$, Fig. 9). En este estudio, hemos intentado corroborar la extracción de ADN también en los AND entrecruzados con GP sin éxito. Aparentemente, el uso de GP (0,10% y 0,25%) afectó al proceso de digestión enzimática y, por tanto, a la purificación del ADN, dando lugar a datos poco fiables (datos no mostrados).

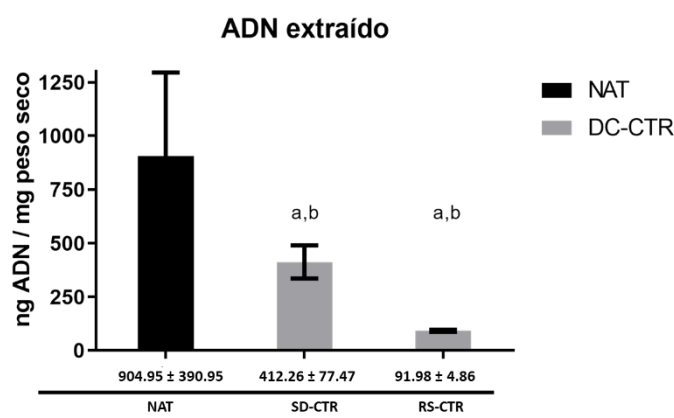


Figura 9: Representación gráfica y numérica del contenido de ADN en los nativos y en los AND. El ADN extraído se representa como valores medios \pm desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney de la siguiente manera: a= diferencias estadísticamente significativas frente al grupo NAT. b= diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SD-CTR frente a RS-CTR.

1.3. Caracterización biomecánica

Para analizar las propiedades biomecánicas de los nervios nativos, ANDs y GP-ANDs se realizó un ensayo de tracción y los resultados se resumen en la Tabla 4 y la Figura 10.

Tabla 4: Análisis biomecánico de los AND nativos, descelularizados y entrecruzados. Los resultados correspondientes a cada parámetro biomecánico se muestran como valores medios \pm desviación estándar.

Grupos	Tensión en la fractura (MPa)	Tensión en la fractura (%)	Extensión (mm)	Módulo de Young (MPa)
NAT	3.33 \pm 0.79	56.97 \pm 4.68	5.99 \pm 0.36	13.40 \pm 3.21
SD-CTR	4.36 \pm 0.82	55.08 \pm 15.89	8.17 \pm 2.06	16.70 \pm 5.23
SD-GP 0.10%	6.16 \pm 0.96	83.16 \pm 1.13	8.98 \pm 0.46	15.61 \pm 2.25
SD-GP 0,25%	6.46 \pm 1.31	78.64 \pm 14.86	8.51 \pm 1.76	18.73 \pm 3.70
RS-CTR	2.47 \pm 0.35	51.02 \pm 5.82	5.61 \pm 0.90	9.81 \pm 2.44
RS-GP 0.10%	3.76 \pm 0.70	58.55 \pm 8.35	7.31 \pm 1.24	16.63 \pm 1.44
RS-GP 0,25%	4.22 \pm 0.20	64.24 \pm 12.61	7.75 \pm 1.76	16.02 \pm 3.69

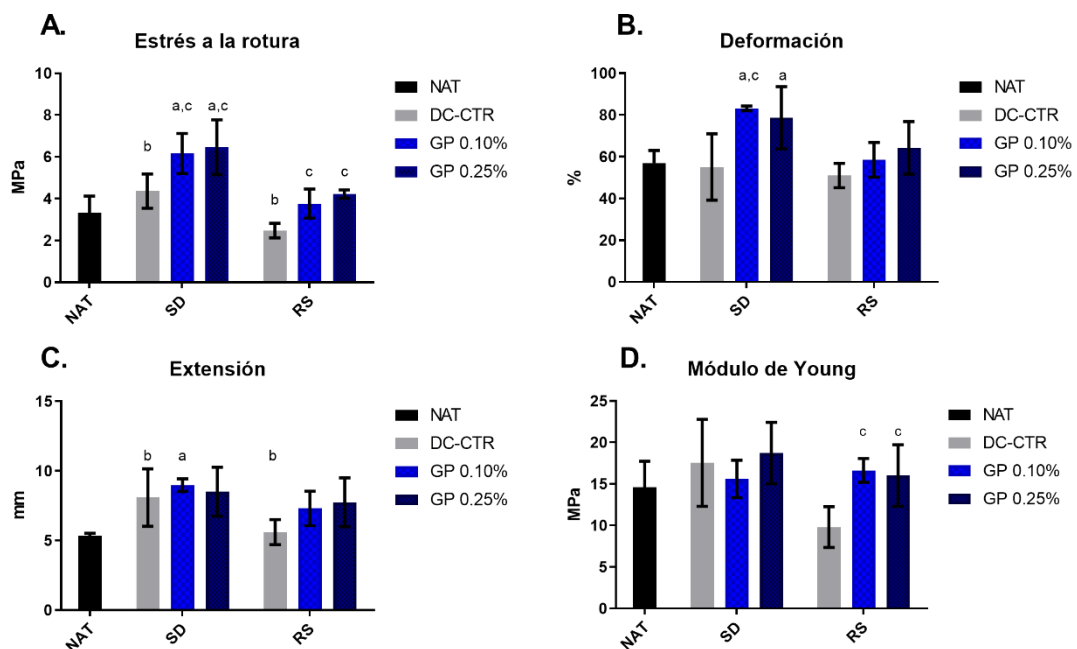


Figura 10: Representación gráfica de los resultados de los ensayos de tracción de los nervios nativos y de los ANDs. Nótese que el DC-CTR indicó los valores de los ANDs no entrecruzados por SD o RS. Estos análisis demostraron claramente el impacto de la descelularización del tejido nervioso (procedimientos SD y RS) y el posterior entrecruzamiento con GP en las propiedades biomecánicas generales de las AND, destacando el aumento de la mayoría de estos valores con el uso de GP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney como sigue: a= diferencias estadísticamente significativas frente al grupo NAT. b= diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SD-CTR frente a RS-CTR. c= diferencias estadísticamente significativas frente

a su correspondiente grupo DC-CTR. *d*= diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de GP 0,10% frente a GP 0,25% utilizada en cada condición de descelularización (SD o RS).

El análisis de los valores de tensión a la fractura (Fig. 10.A) no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos SD-CTR y RS-CTR y el grupo nativo, pero las diferencias entre los grupos SD-CTR y RS-CTR fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Además, los ANDs entrecruzados con GP (0,10 y 0,25%) mostraron valores de tensión a la rotura significativamente mayores ($p < 0,05$) que su correspondiente grupo de control descelularizado, que en el caso de ambos grupos SD-GP las diferencias fueron significativas en comparación con el grupo NAT ($p < 0,05$).

Además, se observaron valores significativamente más altos de ambos GP grupos SD-GP ($p < 0,05$) en la tensión a la rotura cuando se compararon con el grupo nativo (Fig. 10.B). Los valores de extensión fueron significativamente menores en el grupo RS-CTR que en el grupo SD-CTR, y el SD-GP 0,10% presentó diferencias significativas con el grupo nativo (Fig. 10.C). Finalmente, ambos grupos RS-GP fueron significativamente mayores que su grupo control descelularizado en los valores del módulo de Young ($p < 0,05$; Fig. 10.D).

No se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) con el uso de concentraciones de 0,10% o 0,25% de GP dentro de cada técnica de descelularización a nivel biomecánico en ninguna prueba.

1.4 Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo* (interacción célula-biomaterial)

El impacto de los métodos de descelularización y del entrecruzamiento con GP en las interacciones rADSC-biomaterial, o la biocompatibilidad *ex vivo*, se determinó a las 48 horas con ensayos de L/D, WST- 1 y de ADN liberado.

El ensayo L/D morfofuncional demostró la presencia de células viables adheridas a la superficie de todos los ANDs generados (Fig. 11.A). Además, se observaron claramente células muertas (fluorescencia roja) en el grupo de control negativo 2D, tal como se esperaba (Fig. 11.A). En los grupos SD, las células viables se encontraron en menor cantidad que en los grupos RS. Además, las células

tendían a ser más alargadas, por tanto comparables al grupo de control positivo 2D, en el grupo RS-CTR que en las otras condiciones experimentales. Cabe destacar que el entrecruzamiento con GP (0,10% y 0,25%), independientemente del procedimiento de descelularización utilizado, afectó mínimamente a la adhesión de las células viables a la superficie de los ANDs. En el caso del grupo SD, no se observaron diferencias claras entre el grupo SD-CTR y el grupo SD-GP. Sin embargo, cuando la concentración de GP se incrementó del 0,10 al 0,25% en los grupos de RS, las células tendieron a perder su morfología fusiforme y se observaron extensiones citoplasmáticas más cortas (Fig. 11.A). Además, se observaron pocas células muertas dentro de todos los AND generados. Es probable que las células muertas, incapaces de adherirse a los biomateriales, fueran eliminadas durante el proceso de tinción.

Con el ensayo WST-1 (datos resumidos en la Tabla 5) fue posible observar un alto nivel de actividad metabólica celular dentro de los grupos SD y RS-CTR siendo estos valores comparables al grupo de control técnico 2D positivo (Fig 11). Además, el WST-1 reveló una reducción significativa ($p < 0,05$) de la absorbancia con el uso de GP en comparación con sus controles (SD-CTR o RS-CTR respectivamente) (Fig 11). Cuando se compararon los valores de WST-1 entre ambas concentraciones de GP utilizadas dentro de los AND, las diferencias sólo fueron significativas entre los grupos SD- GP 0,10% vs. SD-GP 0,25% ($p = 0,12$).

Tabla 5: Resultados ex vivo de los análisis cuantitativos de biocompatibilidad WST-1 y ADN liberado. Los resultados obtenidos con estos análisis bioquímicos se muestran como valores medios \pm desviación estándar. Además, los resultados de WST-1 y del ADN liberado se normalizaron con sus controles 2D positivos o negativos, respectivamente, que representaban el 100%.

	WST-1		ADN liberado	
	(Abs 450 nm)	(%)	(ng/ul)	(%)
	Media \pm SD	Normalizado	Media \pm SD	Normalizado
SD-CTR	0,32 \pm 0,12	87,35	133,94 \pm 5,09	15,66
SD-GP 0,10 %,	0,13 \pm 0,03	34,70	120,91 \pm 2,87	14,14
SD-GP 0,25%	0,18 \pm 0,03	48,62	137,28 \pm 5,83	16,06
RS-CTR	0,48 \pm 0,13	129,43	137,16 \pm 7,88	16,04
RS-GP 0,10%	0,20 \pm 0,02	54,81	127,41 \pm 1,92	14,90
RS-GP 0,25%	0,15 \pm 0,06	41,36	131,61 \pm 9,12	15,39
2D + CTR	0,37 \pm 0,07	100,00	127,14 \pm 2,26	18,33
2D - CTR	0,00 \pm 0,26	0,00	885,03 \pm 7,11	100,00

La cuantificación del ADN (datos resumidos en la Tabla 5) demostró valores significativamente menores en las condiciones experimentales en comparación con el grupo control negativo 2D ($p < 0,05$), donde se liberó el 100% del ADN (Fig. 11C). Además, los valores de ADN fueron significativamente mayores en el grupo control positivo 2D en comparación con todos los AND generados (Fig. 11C). Cuando se analizaron los valores de ADN en los grupos de SD, sólo el grupo SD-GP 0,10% mostró valores significativamente menores que los grupos SD-CTR y SD-GP 0,25% respectivamente ($p < 0,05$). Resultados similares se observaron en los grupos de RS, donde las diferencias sólo fueron significativas entre RS-CTR y RS-GP 0,10% ($p < 0,05$) (Fig. 11C).

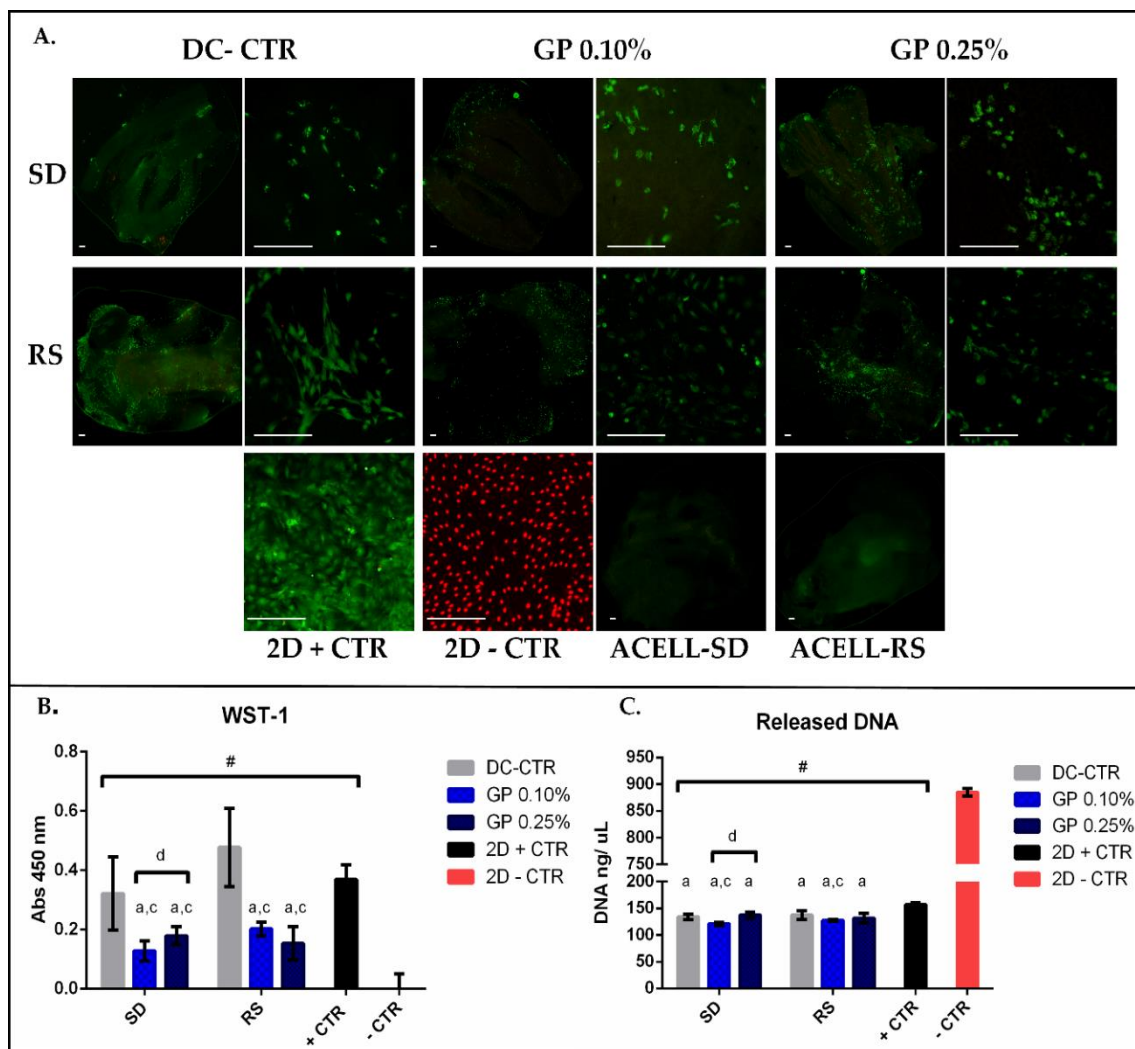


Figura 11: Perfil de interacción célula-biomaterial ex vivo. Se muestra el comportamiento de las rAMSC cultivadas dentro de los AND para A) Análisis de vivo y muerto. Barra de escala = 200 μm; B) WST-1; C) Cuantificación del ADN liberado. Nervios descelularizados en función del método de descelularización Sondell (SD) o Roosens (RS) y de la concentración de GP utilizada. Además, los procedimientos no entrecruzados se indicaron como control descelularizado (DC-

CTR). Los controles negativos y positivos 2D se indicaron como 2D -CTR y 2D +CTR respectivamente. Para A se utilizaron los AND no sembrados con células de ambos métodos de descelularización (ACELL SD y RS) con el fin de confirmar que no quedaban células después del proceso de descelularización. Para B y C se graficaron los valores medios con sus respectivas barras de error correspondientes a las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney como sigue: #= diferencias estadísticamente significativas frente a 2D - CTR. a= diferencias estadísticamente significativas frente a 2D + CTR. b= diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SD-CTR frente a RS-CTR. c= diferencias estadísticamente significativas frente a su correspondiente grupo DC-CTR. d= diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de GP 0,10% frente a GP 0,25% utilizada en cada condición de descelularización (SD o RS).

2. Optimización de un nuevo método de descelularización para nervio periférico

2.1 Diseño y generación de nuevos métodos de descelularización neural

En este trabajo se desarrollaron, caracterizaron y compararon tres nuevos protocolos de descelularización (P1, P2 y P3) con el método clásico de descelularización de Sondell (SD) [195] y se utilizaron nervios nativos (NAT) como grupo de control. Los diferentes métodos de descelularización se han descrito previamente en el apartado 2.1 de materiales y métodos de la presente Tesis Doctoral.

2.2 Caracterización histológica y estructural

En cuanto a la caracterización histológica de los injertos acelulares generados, el análisis mediante HE puso de manifiesto que la estructura histológica general de los nervios periféricos estaba relativamente bien conservada tras la descelularización en todos los grupos, siendo el grupo P1 el más similar al grupo NAT (Fig. 12A). Los nervios periféricos nativos (utilizados como grupo control) presentaban su típica organización estromal con capas epineurales, perineurales y endoneurales bien organizadas. Después de todos los procesos de descelularización, se detectaron algunos cambios estructurales. En el caso del grupo de SD, la tinción mediante HE puso de manifiesto una clara alteración del compartimento epineural y endoneural, mientras que en los otros grupos las capas de tejido conectivo perifascicular estaban menos afectadas (Fig. 12A). En relación con la conservación de los núcleos, la tinción mediante HE y especialmente con DAPI no reveló la presencia de núcleos bien conservados, pero se detectó una débil señal de ADN en el grupo de SD (Fig. 12B).

Con el fin de determinar si algunos restos de proteínas celulares persistían tras los procedimientos de descelularización, se realizó una inmunohistoquímica para las proteínas S-100, NFL y vimentina (utilizados como marcadores de las CS, los axones y los fibroblastos, respectivamente) (Fig.12.C-E). Los nervios nativos presentaron el típico patrón de señal positiva de estas proteínas. Cuando se evaluaron estas proteínas en los AND, se observaron reacciones

inmunohistoquímicas débiles para S-100 y negativas para VIM, por el contrario, se observaron señales positivas de NFL en todos los grupos siendo más débiles en los grupos SD y P1 (Fig. 12 C-E).

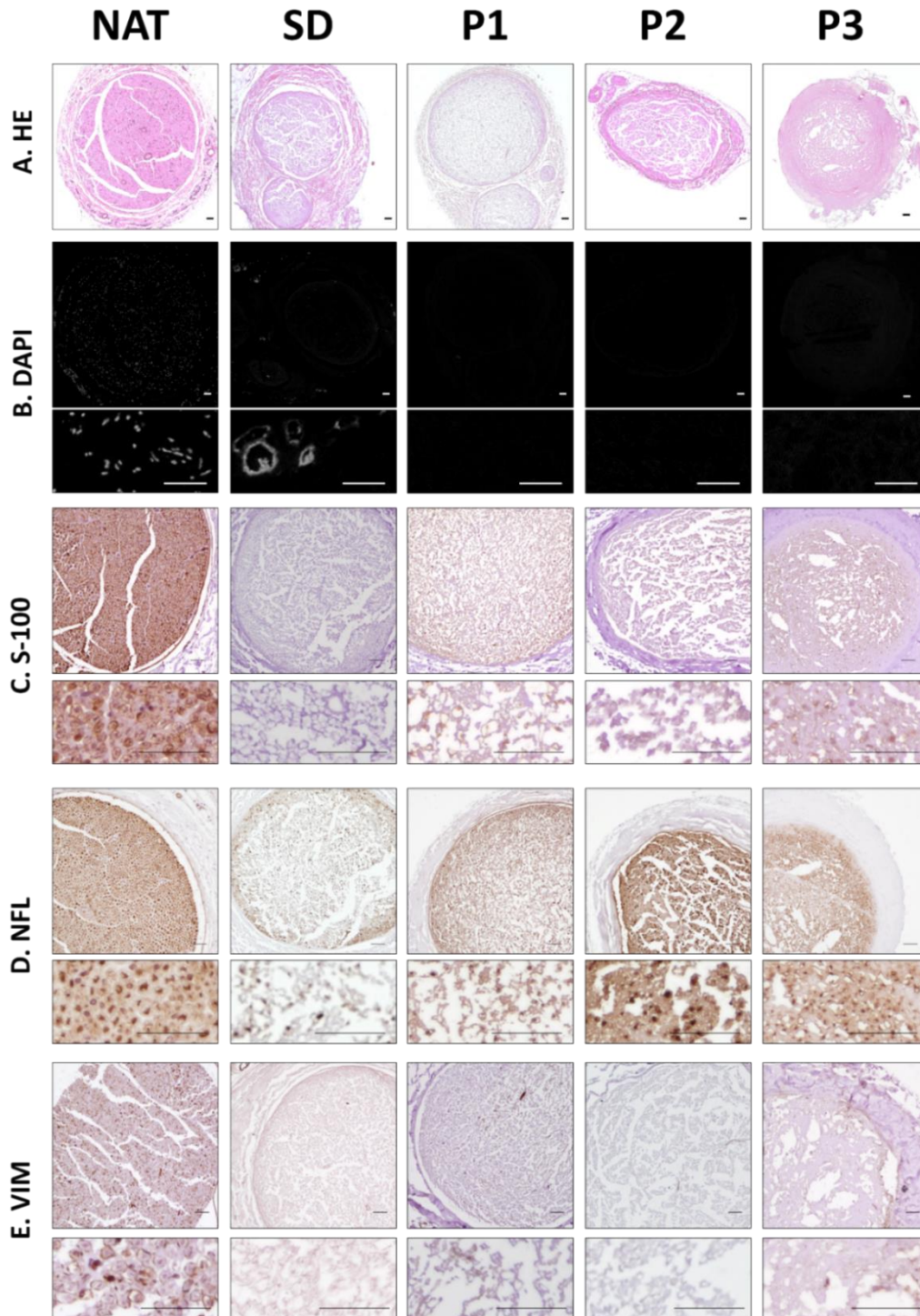


Figura 12: Evaluación histológica e inmunohistológica de los componentes celulares que permanecieron en los diferentes grupos de AND. A) La morfología general de los grupos de

estudio se evaluó mediante el método histoquímico de hematoxilina-eosina. B) Imágenes de microscopía fluorescente de nervios teñidos con el agente fluorocromo intercalante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar restos de ADN. C) Inmunodetección del marcador de CS S-100. D) Evaluación inmunohistoquímica de la proteína citoesquelética neurofilamento (NFL). E) Inmunodetección de la vimentina (VIM) como proteína citoesquelética de los fibroblastos.

Para evaluar el impacto de los diferentes protocolos de descelularización en la matriz extracelular, se realizaron análisis histoquímicos con AB, PS y MCOLL, inmunohistoquímicos (laminina (LAM)) y ultraestructurales (MEB y MET) (Fig. 13). La tinción con AB (Fig. 13.A) mostró la disminución de sGAGs a nivel intrafascicular en todos los grupos en comparación con los nervios nativos. Estas moléculas no fibrilares fueron eliminadas eficazmente, especialmente en el grupo de SD, de todas las capas histológicas con los diferentes protocolos, excepto el P1, que presentó una mayor conservación de sGAGs, concretamente en el compartimento endoneural, que los otros grupos de descelularización (Fig. 13.A). Estos hallazgos fueron corroborados por los análisis cuantitativos de la intensidad del área externa teñida y el área ocupada por la reacción histoquímica AB a nivel endoneural (Fig. 14.A-B). En este sentido, todos los ANDss revelaron una buena preservación de los sGAGs de la capa perineural y del tejido conectivo epineural circundante (Figura 14.A), conservando todos los grupos más del 94% de la señal NAT en estos compartimentos. Sin embargo, todos los ANDs presentaron valores significativamente menores de intensidad de AB del área externa teñida ($p < 0,05$) que el grupo NAT, excepto P1 ($p > 0,05$). De hecho, P1 fue el grupo descelularizado que mostró una mejor conservación de sGAGs en el compartimento externo, siendo significativamente superior a los otros grupos de descelularización SD, P2 y P3 ($p < 0,05$), pero no se encontraron diferencias significativas entre estos tres grupos ($p > 0,05$). Por otra parte, la evaluación de la fracción de área endoneural teñida con AB (Figura 14.B) mostró una disminución significativa de los valores ($p < 0,05$) después de la descelularización sólo en los grupos de SD y P3 cuando se compararon con el grupo NAT. Además, el grupo de SD presentó la mayor pérdida de sGAGs a nivel endoneural diferenciándose significativamente de P1 y P3 ($p < 0,05$) pero no de P2 ($p > 0,05$).

La tinción PS mostró una conservación relativamente buena de la red tridimensional de colágeno después de todos los métodos de descelularización estudiados (Fig. 13.B). En los grupos de SD y P2, el compartimento perifascicular presentó una intensidad más débil de la señal positiva de PS y se observó una pérdida de la organización estructural y compactación del colágeno, mientras que el grupo P3 mostró una compactación estructural y el aumento de la intensidad de la tinción en las áreas mencionadas. Por el contrario, el grupo P1 presentó un patrón estructural de la MEC más similar al del grupo NAT. Por último, todos los grupos mostraron una conservación moderadamente buena a nivel endoneural. Estos hallazgos fueron corroborados por el análisis cuantitativo mostrando una disminución de la reacción histoquímica de PS en todos los compartimentos histológicos de los diferentes grupos descelularizados excepto P3 (Fig. 14.A). Concretamente, la evaluación de los compartimentos externos de la MEC presentó una disminución significativa de los valores de intensidad de PS ($p < 0,05$) después de la descelularización, excepto el P3, que curiosamente presentó el mayor valor de intensidad. Además, el área ocupada por la reacción histoquímica de PS a nivel endoneural (Fig. 14.B) mostró valores significativamente menores ($p < 0,05$) de SD y P1 cuando se compararon con NAT.

En referencia a la glicoproteína de la lámina basal LAM, su análisis inmunohistoquímico confirmó la conservación de esta molécula de marcando los tubos endoneurales en todos los grupos de descelularización, a excepción del grupo de SD, que no presentó reacción inmunohistoquímica (Fig. 13.C).

A nivel endoneural la mielina y la red de colágeno circundante se evaluó mediante un método histoquímico simultáneo de mielina y colágeno (MCOLL). Este procedimiento mostró la organización característica de la mielina y el contenido de colágeno bien delineado en los nervios sanos (Fig.13.D). Se observó una débil reacción histoquímica de la mielina en los grupos de SD y P1 inmersos en una delgada red de colágeno. A diferencia de estos grupos, P2 y P3 presentaron una red de colágeno endoneural más gruesa, especialmente en P3, sin reacción positiva de mielina en su interior.

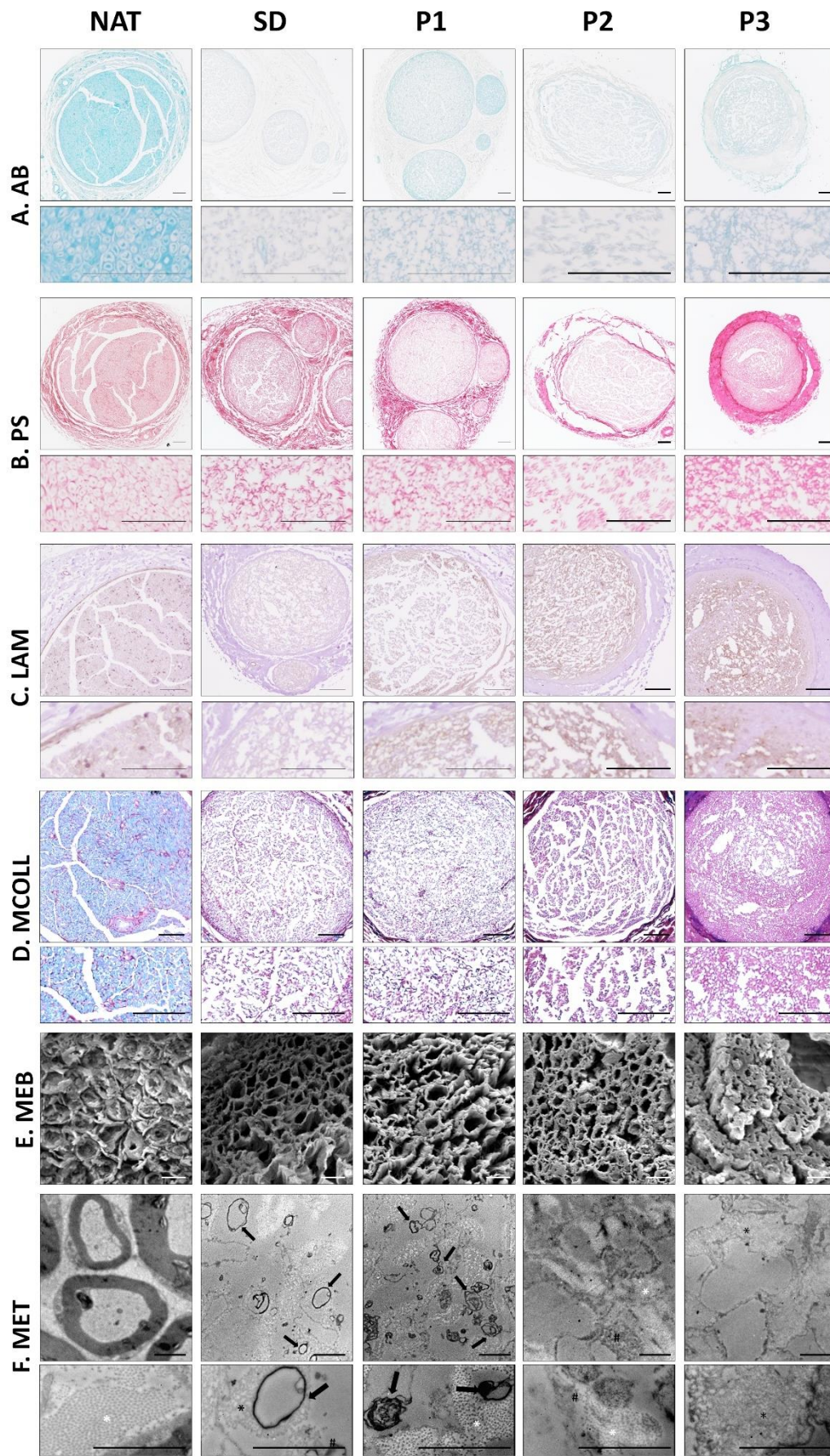


Figura 13: Evaluación histológica, inmunohistológica y ultraestructural de la MEC del nervio periférico tras los diferentes procedimientos de descelularización. A) Evaluación de los proteoglicanos ácidos mediante el método histoquímico del azul alcian (AB). B) Identificación histoquímica de los colágenos fibrilares mediante la tinción de Picrosirius (PS). C) Inmunotinción de la proteína de la lámina basal lamimin (LAM). D) La mielina y la red de colágeno circundante endoneural se evaluaron con el método histoquímico mielina-colágeno (MCOLL) para la identificación de la mielina (azul claro) y las fibras de colágeno (rojo). E) Imágenes SEM y F) TEM de secciones transversales de regiones centrales de las ANDss generadas. Barra de escala: A-D = 100 μm ; E = 10 μm y F=2 μm .

El análisis ultraestructural mediante MEB mostró la eficiente eliminación de la mielina dentro de los tubos endoneurales tras la descelularización en todos los grupos (Fig. 13.E). Este método mostró que SD y P1 presentaban una estructura endoneural ligeramente desorganizada (Fig. 13.E) y P2 y P3 presentaban una red endoneural de mayor espesor. Este aumento del espesor endoneural no sólo produjo una mejor organización y mayor homogeneidad en el compartimento endoneural en P2, sino también el colapso de los tubos endoneurales en P3.

Por otro lado, la MET reveló la presencia de restos de mielina y residuos de membrana y citoplasma en los grupos de SD y especialmente P1, pero no en P2 y P3. Además, en lo que se refiere a la conservación de la red de colágeno endoneural, P1 y P2 presentaron una buena preservación de la misma tras la descelularización similar a la del grupo NAT, pero no así SD y P3 donde la estructura de colágeno fue destruida (Fig. 13.F).

2.3 Análisis bioquímicos de la matriz extracelular resultante

Se utilizaron ensayos de kits bioquímicos para extraer y medir la cantidad total de ADN y sGAG en todos los grupos experimentales y en los controles. La cantidad de ADN y sGAG extraídos de los diferentes grupos experimentales se resume en la Figura 14.C-D. La cuantificación del ADN extraído presentó una pérdida significativa de ADN en todos los protocolos de descelularización probados en comparación con el grupo NAT. Comparando los diferentes métodos de descelularización, el método clásico de SD presentó un valor significativamente mayor de ADN extraído ($p < 0,05$) que los otros grupos, y los métodos enzimáticos P1 y P2 mostraron valores significativamente menores de ADN que P3 ($p < 0,05$), pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos ($p > 0,05$). Además, los sGAG totales de SD, P2 y P3 fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los del grupo NAT y P1. De hecho, SD

fue el método que eliminó los sGAG de forma más eficiente cuando se comparó con P2 y P3 ($p < 0,05$), pero no se encontraron diferencias significativas entre P2 y P3 ($p > 0,05$).

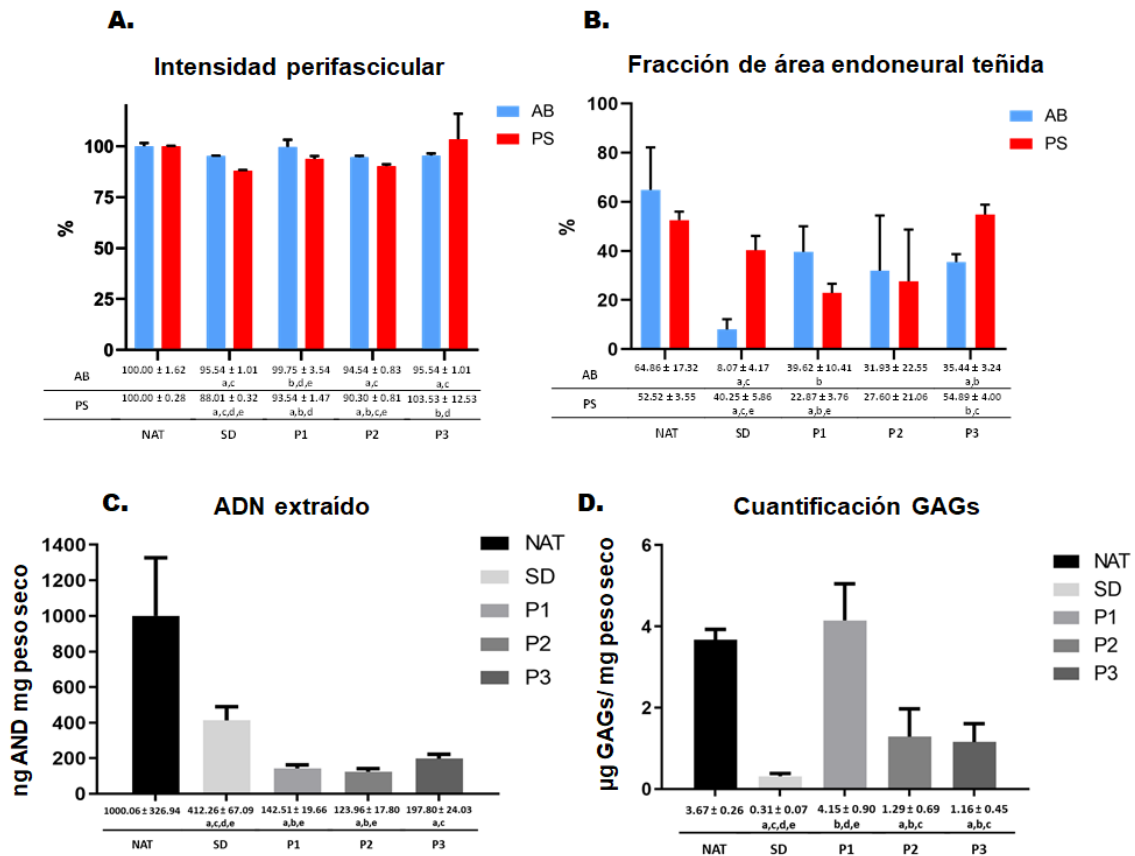


Figura 14: Análisis cuantitativos histoquímicos y de biomoléculas de los ANDs. A) Evaluación histoquímica cuantitativa de la intensidad del área externa (epineuro y perineuro) y B) fracción del área endoneural teñida de azul alción (AB) y Picrosirius (PS) en los grupos de nervio nativo y descelularizado. C) Cuantificación del ADN extraído. D) Cuantificación del total de sGAGs extraídos. La representación gráfica y numérica se expresó como valores medios ± valores de desviación estándar (barras de error). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney y se indicaron como sigue: a = frente al grupo NAT. b = frente al grupo SD. c = frente a P1. d = frente a P2 y e = frente a P3.

2.4 Caracterización biomecánica y transparencia

Para determinar el impacto en la MEC por los diferentes métodos ensayados, se sometieron a pruebas de transparencia y de tracción (Fig. 15 y Tabla 6). La eliminación de las diferentes biomoléculas en la MEC del nervio se evaluó mediante la prueba de transparencia, evaluando macroscópicamente la cantidad de luz que pasaba a través de la muestra (Fig. 15.A-B). De hecho, P1 mantuvo la transparencia similar al grupo NAT ($11,42 \pm 1,28\%$ vs $9,47 \pm 2,24\%$; $p > 0,05$) y ambos grupos presentaron una transparencia significativamente menor que el

resto de los grupos descelularizados (SD, P2 y P3; $p < 0,05$). El valor más alto de transparencia lo presentó el grupo SD ($20,39 \pm 2,59\%$) y fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los otros grupos descelularizados P2 ($13,40 \pm 1,48\%$) y P3 ($14,62 \pm 1,00\%$).

En referencia al ensayo de tracción, P2 ($3,01 \pm 0,49$ MPa) y P3 ($2,65 \pm 0,64$ MPa) presentaron valores significativamente menores de tensión a la rotura que el grupo de SD ($4,36 \pm 0,46$ MPa; $p < 0,05$), lo que aumentó ligeramente su rigidez respecto al grupo NAT ($3,39 \pm 0,70$ MPa; $p > 0,05$) pero sin diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que los valores de la deformación en el momento de la fractura fueron similares en todos los grupos, excepto en el P2 ($39,76 \pm 3,68\%$), que mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) cuando se comparó con los grupos NAT ($55,38 \pm 10,64\%$) y P3 ($52,16 \pm 5,92\%$). En el caso del módulo de Young no se encontraron diferencias significativas entre los grupos probados.

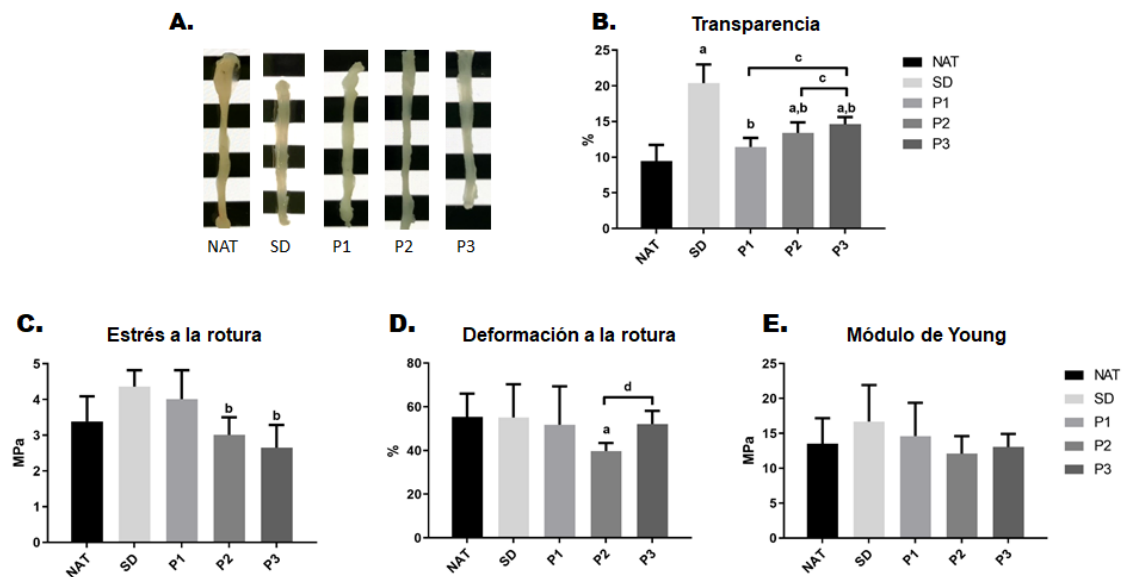


Figura 15: Evaluación de la transparencia y las propiedades de tracción de los ANDs generados. A) Imágenes macroscópicas de los diferentes grupos de estudio. B) Evaluación cuantitativa de la transparencia de los nervios nativos y descelularizados. C) Tensión a la fractura, D) deformación a la fractura y E) módulo de Young se obtuvieron resultados biomecánicos tras el ensayo de tracción de los ANDs y los nervios nativos. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney y se indican como sigue: a = frente al grupo NAT. b = frente al grupo SD. c = frente a P1. d = frente a P2 y e = frente a P3.

Tabla 6: Análisis biomecánico de los nervios nativos y descelularizados. Los resultados correspondientes a cada parámetro biomecánico se muestran como valores medios \pm desviación estándar.

	Transparencia (%)	Tensión a la fractura (MPa)	Deformación en la fractura (%)	Módulo de Young (MPa)
NAT	9,47 \pm 2,24	3,39 \pm 0,70	55,38 \pm 10,64	13,50 \pm 3,67
Sondell	20,39 \pm 2,59	4,36 \pm 0,46	55,08 \pm 15,25	16,70 \pm 5,23
P1	11,42 \pm 1,28	4,01 \pm 0,81	51,75 \pm 17,62	14,62 \pm 4,76
P2	13,40 \pm 1,48	3,01 \pm 0,49	39,76 \pm 3,68	12,09 \pm 2,52
P3	14,62 \pm 1,00	2,65 \pm 0,64	52,16 \pm 5,92	13,06 \pm 1,87

2.5 Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo* (interacción célula-biomaterial)

Para evaluar la biocompatibilidad *ex-vivo* de los ANDs generados, se sembraron rADSC en el compartimento endoneuronal del nervio. A continuación, se determinó la citocompatibilidad a las 48 horas con las pruebas de viabilidad celular L/D y WST-1.

El ensayo L/D morfofuncional confirmó la presencia de una cantidad similar de rADSC viables adheridas (fluorescencia verde) a la superficie de todos los ANDs producidos (Fig. 16.A), excepto el grupo de SD que mostró una menor cantidad de células. Además, se detectaron claramente células muertas (fluorescencia roja) en el grupo de control negativo 2D (Fig. 16.A). Curiosamente, sólo se observaron unas pocas células muertas dentro de todos los ANDs generados. Este hecho podría explicarse debido a que las células muertas perdieron las proteínas de unión que les permitían permanecer adheridas a la superficie del biomaterial y fueron eliminadas en los pasos de lavado durante el procedimiento de tinción. Además, las células presentadas en el P1 y P2 tendían a ser morfológicamente más similares al grupo de control positivo 2D que los grupos de SD y P3, donde las células tendían a perder su morfología fusiforme y presentaban extensiones citoplasmáticas más cortas.

El ensayo WST-1 (Fig. 16.B) mostró un alto nivel de actividad metabólica celular en todos los grupos descelularizados, aunque fue significativamente inferior al de control positivo 2D ($p < 0,05$) y los valores normalizados oscilaron entre un

23,76% (grupo de SD) y un 15,68% (grupo P2, Fig. 16.B). Además, cuando se compararon los valores de WST-1 entre los distintos protocolos utilizados, sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos de SD y P2 ($p < 0,05$).

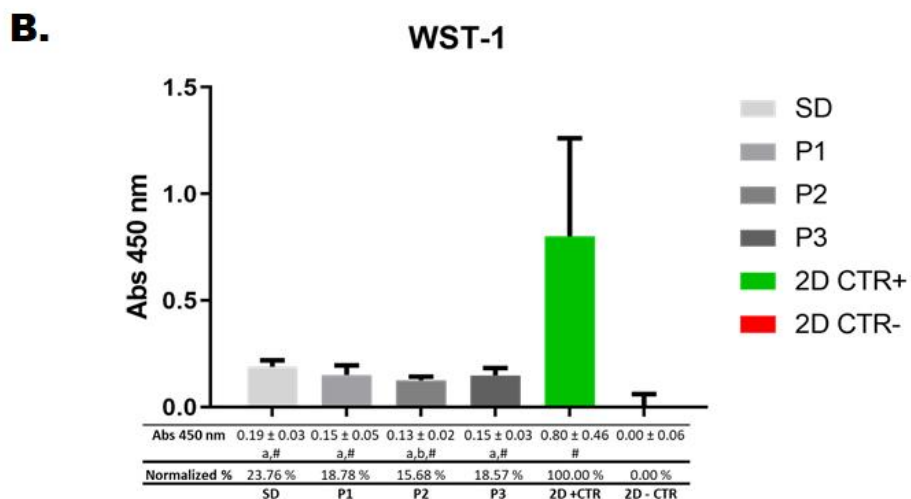
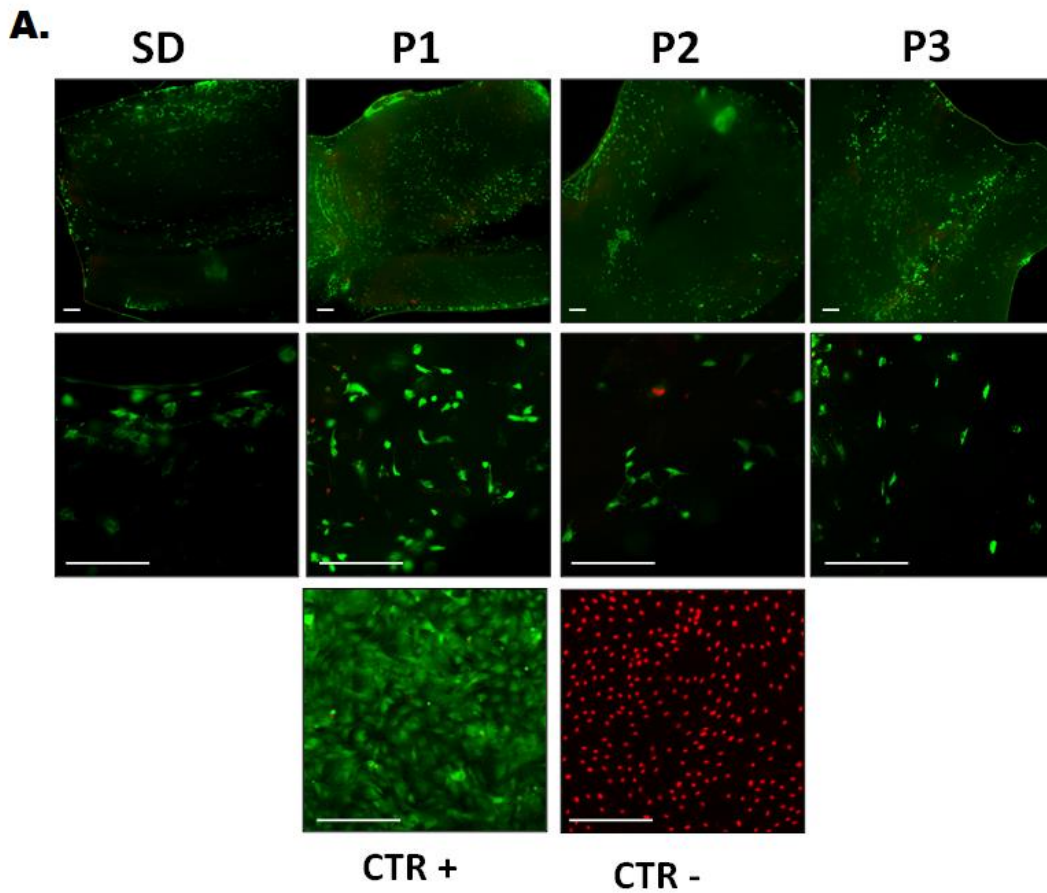


Figura 16: Evaluación de la citocompatibilidad ex vivo. Se muestra el comportamiento de las rAMSC cultivadas en la parte endoneuronal de los ANDs para A) el análisis Live&Dead (L/D) y (B) el ensayo metabólico WST-1cell. Para A) el ensayo L/D se incluyeron ANDs sin células de cada método de descelularización utilizado como controles técnicos para confirmar que estos análisis se realizaron con biomateriales libres de células y que no quedaban células después del

proceso de descelularización. Barra de escala = 200 μm . Para B) se graficaron los valores medios con sus respectivas barras de error que corresponden a las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney como sigue: # = frente a 2D - CTR; a = frente a 2D + CTR; b = frente al grupo SD; c = frente al grupo P1; d = frente al grupo P2; e = frente al grupo P3.

3. Estudios preclínicos de los nuevos aloinjertos descelularizados en el modelo de lesión de nervio ciático de ratas:

3.1 Evaluación *in vivo* de los sustitutos nerviosos descelularizados para la reparación del nervio periférico

Basándose en los resultados *ex vivo* obtenidos, se eligieron los ANDs P1, P2 y SD (como control descelularizado) para su evaluación *in vivo*. Como grupo de control regenerativo se utilizó el método de referencia actual, el autoinjerto (AUTO).

3.1.1. Evaluación clínico-funcional

Las evaluaciones clínicas y funcionales a las 15 semanas se resumieron en la Tabla 7. Evaluando la evaluación clínica de los diferentes grupos, todos los animales operados sufrieron autotomía, siendo SD el grupo que presentó el mayor porcentaje de animales que sufrieron amputaciones (66,67%) y AUTO el menor (16,67%). A pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas en los animales amputados entre los grupos de estudio ($p > 0,05$). Por el contrario, al evaluar el porcentaje de dedos amputados, sólo los grupos de SD (30,00%) y P1 (20,00%) presentaron valores significativamente superiores a CTR (0,00%) aunque no se hallaron diferencias significativas.

En referencia a la evaluación de la recuperación sensorial, todos los grupos descelularizados presentaron un valor de regeneración sensorial considerable en la prueba de pellizco, donde sólo SD presentó valores significativamente inferiores ($2,00 \pm 0,89$; $p < 0,05$) respecto al grupo AUTO ($3,00 \pm 0,00$), no encontrándose otras diferencias significativas ($p > 0,05$). El perfil de recuperación de la función motora determinado por las pruebas de extensión de los dedos del pie y SFI confirmaron que todos los grupos de animales operados no alcanzaron los valores normales detectados en el grupo CTR ($p < 0,05$). En este contexto, los valores medios de la extensión de los dedos de los pies fueron comparables entre los grupos operados ($p < 0,05$), siendo el grupo AUTO el que presentó los valores más altos ($1,33 \pm 0,52$), seguido de P2 ($1,17 \pm 0,75$), P1 ($1,00 \pm 0,63$) y finalmente SD ($0,83 \pm 0,75$). Además, se detectaron resultados similares en el

SFI entre los grupos operados, pero en este caso, P2 mostró el valor de recuperación más favorable ($-71,02 \pm 10,32$) y P1 el menor grado de recuperación motora ($-84,00 \pm 7,48$). Hay que tener en cuenta que la autotomía excluyó a algunos animales de la evaluación del SFI en cada grupo (los detalles se describen en la sección de materiales y métodos).

Tabla 7: Autonomía y evaluación funcional tras 15 semanas de reparación del nervio ciático mediante técnicas de ANDs y autoinjerto nervioso. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney de la siguiente manera: a = frente a AUTO; b = frente al grupo SD; c = frente al grupo P1; d = frente al grupo P2.

Grupo	Presencia Amp %	Dedos Amp %	Prueba de presión	Prueba de extensión articular	SFI
CTR	0,00	0,00	$3,00 \pm 0,00$	$3,00 \pm 0,00$	$-13,11 \pm 8,46$
AUTO	16,67	10,00	$3,00 \pm 0,00$	$1,33 \pm 0,52^a$	$-80,30 \pm 10,30^a$
SONDELL	66,67	$30,00^a$	$2,00 \pm 0,89^b$	$0,83 \pm 0,75^a$	$-75,62 \pm 3,36^a$
P1	50,00	$20,00^a$	$2,17 \pm 0,98$	$1,00 \pm 0,63^a$	$-84,00 \pm 7,48^a$
P2	33,33	16,67	$2,50 \pm 1,22$	$1,17 \pm 0,75^a$	$-71,02 \pm 10,32^a$

3.1.2 Evaluación hematológica y serológica

Los análisis hematológicos cuantitativos revelaron algunos cambios en el perfil hematológico 15 semanas después de la cirugía (Tabla 8). Los valores de los parámetros relacionados con los glóbulos rojos (RBC, HGB y MCV) y los leucocitos (WBC, LYM, MXD y NEUT) fueron muy comparables entre los grupos operados (AUTO, SD, P1 y P2) y los animales sanos (grupo CTR). No obstante, se detectaron algunas diferencias estadísticas entre las condiciones del estudio. Evaluando el recuento de MCV, AUTO y SD mostraron una disminución significativa de estos valores respecto a CTR ($p < 0,05$). Además, AUTO y P2 presentaron valores significativamente menores de recuento de MXD y NEUT que el grupo CTR ($p < 0,05$). Curiosamente, en el caso del volumen plaquetario medio (VPM) el grupo CTR presentó un valor ($10,13 \pm 0,84$) que está fuera del rango fisiológico estándar para ratas hembras descrito por Kampfmann et al. [207] (6,7-7,8) y mostró valores significativamente más altos ($p < 0,05$) que todos los grupos operados excepto P1. De hecho, P1 mostró valores más altos ($p < 0,05$) de VPM que AUTO y P2. Al evaluar las enzimas hepáticas, en particular SD, los resultados mostraron un ligero aumento de ALTL y ASTL, mientras que todos los

demás grupos operados presentaron un ligero descenso cuando se compararon con el grupo CTR, aunque sólo se encontraron diferencias significativas en ALTL y en ASTL ($p < 0,05$; tabla 8). Además, la otra enzima hepática como BILT y los valores relacionados con el riñón como CRE y UREA no mostraron ninguna diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p > 0,05$). Por otra parte, al evaluar el perfil lipídico de los distintos grupos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos operados y el grupo CTR. Sin embargo, cuando analizamos los resultados obtenidos para HDLC y TRYGL el grupo que mostró valores más bajos fue el SD existiendo diferencias significativas en la comparación frente a P2 y AUTO respectivamente ($p < 0,05$; tabla 8). En cuanto a la enzima relacionada con el páncreas AMYL, el grupo AUTO presentó valores significativamente más altos que el grupo SD y P1 ($p < 0,05$), pero no con respecto al grupo CTR.

Al evaluar el parámetro relacionado con la alteración muscular, la creatina quinasa (CK), se detectaron diferencias significativas en los grupos AUTO y P2 respecto a CTR y SD ($p < 0,05$), lo que sugiere, efectivamente, unas alteraciones musculares en dichos grupos. Por último, P2 mostró una interesante reducción significativa ($p < 0,05$) de los valores sanguíneos de GLUC cuando fue comparado con AUTO.

Tabla 8: Resultados hematológicos y bioquímicos tras 15 semanas de reparación de nervios periféricos con ANDs y técnica de autoinjerto.

Aplicación	Parámetros	Unidades	CTR	AUTO	SD	P1	P2	Diferencias significativas (p < 0,05)
Eritrocitos	RBC	10 ⁶ mL ⁻¹	7,60±0,48*	7,68±0,62	7,43±0,39*	7,93±0,67*	7,89±0,33*	-
	HGB	g/dL	14,27±0,74	14,33±0,71	13,40±0,67	14,15±1,38	14,83±0,8	SD vs P2
	MCV	fL	57,10±0,69*	55,17±0,95	55,07±1,00	55,95±2,20	56,52±2,42	CTR vs AUTO, SD
Leucocitos	WBC	10 ³ mL ⁻¹	6,60±1,47	9,85±3,05*	7,35±4,60	7,95±3,82	7,77±1,05	-
	LYM	%	90,73±4,79	82,00±8,47	81,83±10,49	83,70±5,42	82,62±6,01	-
		10 ³ mL ⁻¹	6,07±1,59	7,97±2,38	5,68±2,50	6,62±3,1	6,40±1,04	-
	MXD	%	14,70±5,72	15,65±8,75	16,00±7,58	13,30±5,72	15,62±5,36	-
		10 ² mL ⁻¹	2,00±3,46	16,5±10,75	12,5±16,9	11,67±9,33	12,33±4,76	CTR vs AUTO, P2
	NEUT	%	5,23±1,72	2,35±0,86	4,83±3,09	3,00±3,54	1,77±0,89	CTR vs AUTO, P2; SD vs P2
	10 ² mL ⁻¹	3,33±2,08	2,33±1,51*	2,00±1,55*	1,67±1,21*	1,33±0,52*	-	
Plaquetas	MPV	fL	10,13±0,84*	6,28±0,21*	7,68±1,38	7,87±1,34*	6,35±0,20*	CTR vs AUTO, SD, P2; P1 vs AUTO, P2
Hígado	ALT	10 ² U/L	1,16±0,72	0,49±0,12	1,41±1,36	0,49±0,17	0,41±0,09	SD vs P2
	AST	10 ² U/L	2,72±1,77	1,23±0,28	3,09±1,95	1,36±0,2	1,15±0,19	SD vs AUTO, P2
	BILTB	mg/dL	1,91±0,62	2,81±0,82	1,84±0,59	1,95±1,14	1,77±0,84	-
Riñón	CRE	mg/dl	0,55±0,11	0,49±0,08	0,55±0,11	0,45±0,06	0,44±0,07	-
	UREAL	mg/dl	31,33±4,12	32,22±4,62	33,33±3,28	32,18±6,28	32,07±7,73	-
Perfil lipídico	LDLC	mg/dl	9,52±1,31	8,66±5,3	9,20±4,33	7,93±3,14	10,21±2,54	-
	HDLC	mg/dl	41,19±22,61	58,91±20,48	50,09±11,13	58,91±10,63	67,6±8,52	SD vs P2
	TRIGL	10 ² mg/dl	1,97±0,83	1,77±0,52	1,19±0,25	1,34±0,33	1,57±0,64	AUTO vs SD
Pancreas	AMYL	10 ² U/L	16,67±1,59	19,13±1,96	15,09±2,2	16,02±2,12	17,2±1,02	AUTO vs SD, P1
Otros parámetros circulantes	CK	10 ² U/L	5,25±2,75	1,75±0,71	4,10±2,13	3,08±1,93	1,70±0,32	CTR vs AUTO, P2; SD vs AUTO, P2
	IRON	10 ² mg/dl	3,66±0,47	4,01±0,32	3,57±0,51	3,62±0,45	3,72±0,67	-
	GLUC	10 ² mg/dl	1,86±0,31	2,02±0,47	1,90±0,12	1,67±0,28	1,60±0,39	AUTO vs P2

* **Nota:** Los valores de cada parámetro se muestran como valores medios ± desviación estándar, y p < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El símbolo "*" indica los valores que difieren del rango normal de las ratas Wistar hembras según la bibliografía disponible [207].

3.2. Estudios post-mortem

3.2.1 Resultados morfométricos musculares

Los análisis macroscópicos y morfométricos de la pata completa y de los principales músculos inervados por el nervio ciático, como el *gastrocnemius* y el *tibialis anterior*, mostraron una notable pérdida de peso en el lado de la lesión en comparación con el lado contralateral de los grupos descelularizados cuando se compararon con el grupo de referencia AUTO (Fig. 17 y Tabla 9). No obstante, se observaron ligeras diferencias entre los grupos descelularizados (Fig. 17 y Tabla 9). De hecho, se produjo un aumento significativo de la pérdida de peso de la pata completa y del músculo *gastrocnemius* en todos los grupos descelularizados cuando se compararon con AUTO (p < 0,05).

En referencia al músculo *tibialis anterior*, sólo P1 en peso y SD en volumen no existieron diferencias significativas con el grupo AUTO (p > 0,05; tabla 9).

Asimismo, al igual que en el caso del *gastrocnemius*, la única diferencia significativa entre los métodos descelularizados en la pérdida de volumen del músculo tibial fue entre SD y P1 ($p < 0,05$; tabla 9).

Tabla 9: Resumen de los resultados del peso de toda la pierna y de los músculos *gastrocnemius* y *tibialis anterior* después de 15 semanas de reparación del nervio ciático mediante las técnicas de ANDs y de autoinjerto nervioso. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se determinaron con la prueba de Mann-Whitney de la siguiente manera: a = frente a AUTO; b = frente al grupo ANDs; c = entre los grupos P1 frente a P2.

		Morfometría del peso muscular		
		Pata completa	Gastrocnemius	Tibialis anterior
		(g)	(g)	(g)
AUTO	Lado contralateral	5,87 ± 0,06	2,24 ± 0,05	0,67 ± 0,05
	Lado lesionado	4,50 ± 0,16	1,51 ± 0,08	0,44 ± 0,04
	% pérdida	23,31 ± 2,44	32,63 ± 5,00	34,82 ± 10,18
SONDELL	Lado contralateral	6,02 ± 0,30	2,48 ± 0,03 ^a	0,74 ± 0,06
	Lado lesionado	3,87 ± 0,37	1,15 ± 0,21 ^a	0,36 ± 0,08
	% pérdida	35,64 ± 6,89 ^a	53,75 ± 8,68 ^a	50,90 ± 11,78 ^a
P1	Lado contralateral	5,90 ± 0,33 ^c	2,30 ± 0,12 ^b	0,76 ± 0,03 ^{a,c}
	Lado lesionado	3,21 ± 0,26 ^{a,b}	0,82 ± 0,21 ^{a,b}	0,37 ± 0,13
	% pérdida	45,44 ± 5,97 ^a	63,83 ± 10,66 ^a	52,01 ± 16,31
P2	Lado contralateral	5,14 ± 0,27 ^{a,b,c}	2,01 ± 0,36 ^b	0,59 ± 0,07 ^{b,c}
	Lado lesionado	3,13 ± 0,53 ^{a,b}	0,94 ± 0,22 ^a	0,27 ± 0,05 ^{a,b}
	% pérdida	39,04 ± 10,57 ^a	52,15 ± 13,13 ^a	55,04 ± 3,94 ^a

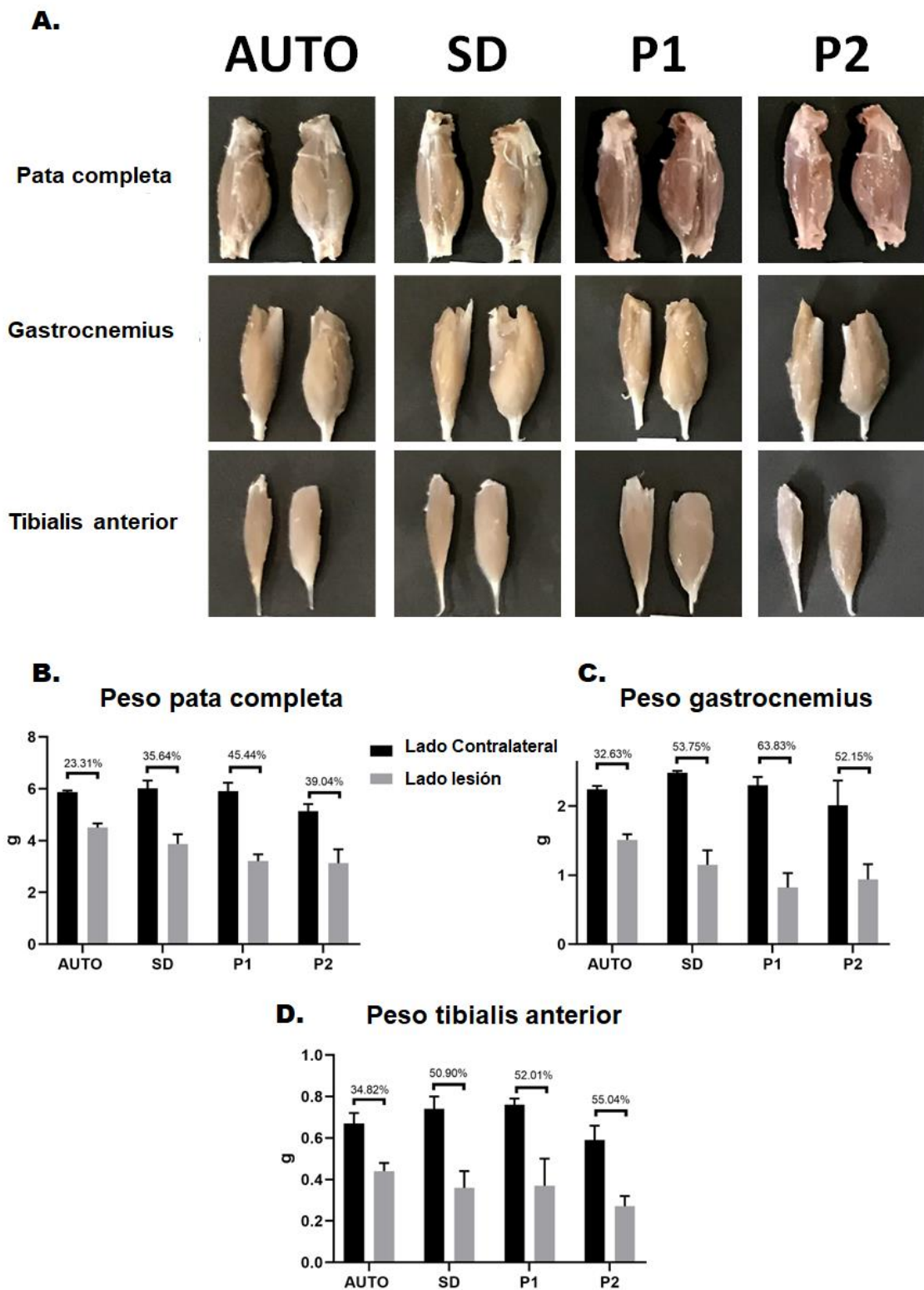


Figura 17: Representación macroscópica y gráfica de los cambios musculares tras 15 semanas de reparación del nervio ciático mediante técnicas de ANDs y autoinjerto. El porcentaje de pérdida se resume en la parte superior de cada grupo de columnas.

3.2.2 Resultados histológicos y estructurales de la regeneración nerviosa

Los análisis histológicos de la parte central del injerto implantado revelaron que se desarrolló un proceso activo de regeneración nerviosa en todos los grupos experimentales operados (Fig. 18). La morfología estructural de los nervios regenerados evaluada mediante la tinción de HE reveló que el proceso de regeneración se produjo principalmente a nivel intrafascicular en el grupo AUTO (Fig. 18.A). Sin embargo, los grupos ANDs presentaron cierto grado de dispersión del proceso de regeneración de los NPs, presentando un número variable de fascículos regenerados, que varió en cada grupo, y que crecieron a nivel epineuronal. Para realizar el análisis y la distribución de las fibras de mielina y de colágeno se llevó a cabo mediante tinción MCOLL (Fig. 18.B). La tinción MCOLL reveló la remielinización en todos los grupos, siendo más abundante en los grupos AUTO y P2, presentando ambos una red de colágeno endoneural más gruesa que la del grupo CTR. Además, el grupo P1 mostró un patrón de mielina regenerada menos intenso y organizado que los otros grupos. Finalmente, el grupo de SD presentó una menor cantidad de fibras mielinizadas dispersas por la infiltración del nuevo tejido endoneural de colágeno generado.

La inmunodetección del marcador S-100 (Fig. 18.C) reveló la distribución de las CS en los diferentes grupos de estudio. En este contexto, el grupo AUTO presentó la distribución más consistente de CS a nivel endoneural que los otros grupos operados, pero sin alcanzar el nivel de organización del grupo CTR. Sin embargo, todos los grupos de ANDs mostraron la presencia del marcador S-100, siendo el grupo P2 el que presentó el patrón de distribución más similar al grupo AUTO, seguido por el P1 y finalmente por el grupo de SD que mostró cambio en la organización de las CS.

Por último, la detección de axones maduros se realizó mediante la inmunodetección del marcador NFL. Así, estos análisis confirmaron un proceso de regeneración activo en la parte central del injerto en todos los grupos operados, a pesar de que no alcanzaron la organización estructural del grupo CTR después de 15 semanas. No obstante, la señal NFL del grupo AUTO fue la más homogénea entre todos los grupos operados, pero no comparable con la del grupo CTR, que mostró un patrón de tamaño más definido y superior de la

red de fibras nerviosas. Finalmente, todos los grupos ANDs presentaron una señal más compartimentada en forma de conos de regeneración, siendo P2 el grupo que presentó la señal más intensa y los axones más desarrollados.

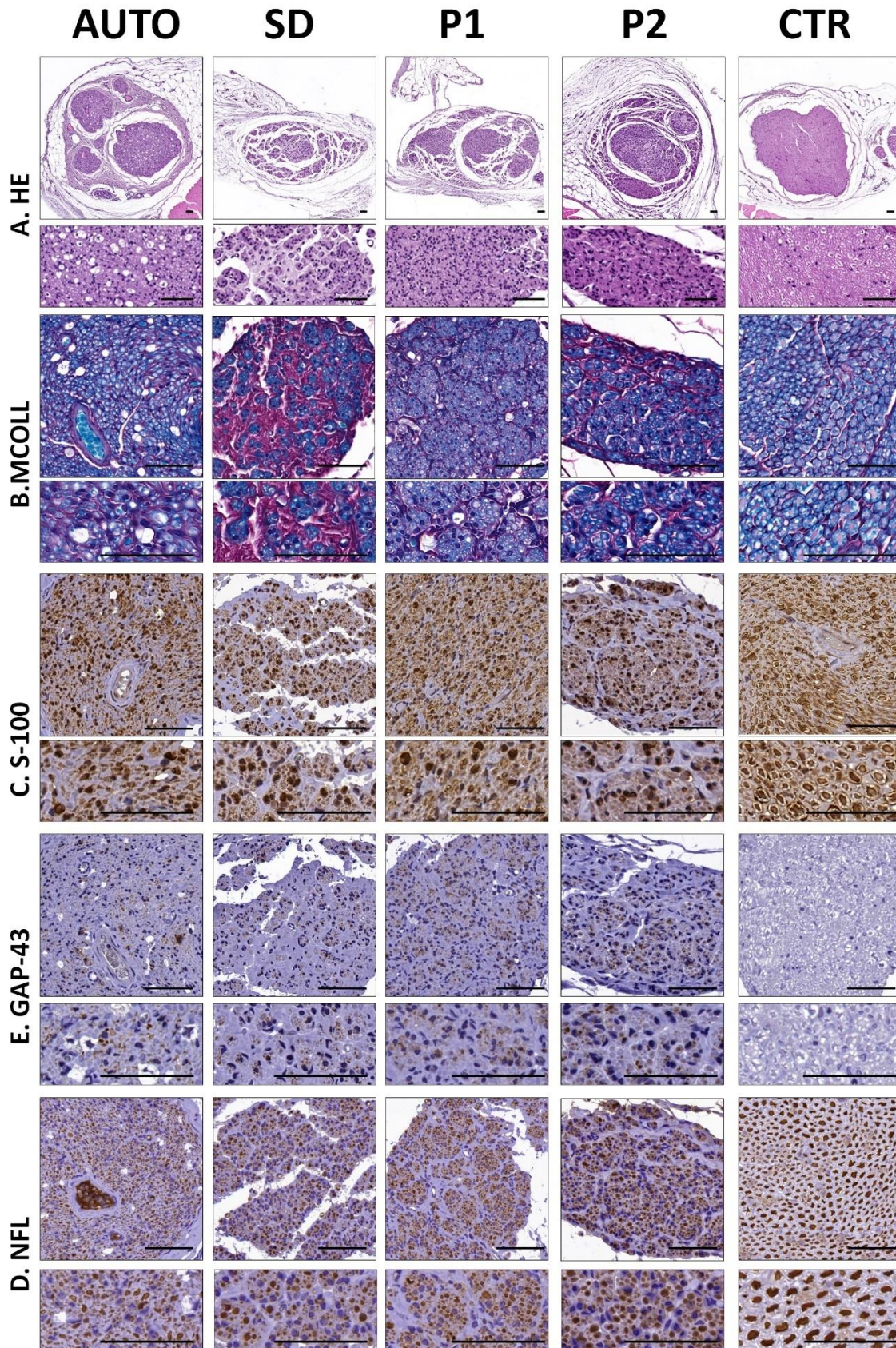


Figura 18: Evaluación histológica de la regeneración del nervio periférico en la región central del injerto tras 15 semanas después de la cirugía. A) Morfología general de los nervios operados y de control evaluada por el método histoquímico de la hematoxilina-eosina (HE). B)

La evaluación del contenido y la distribución de las fibras de mielina y colágeno se realizó mediante el método histoquímico de mielina-colágeno (MCOLL). C) Identificación de las células de Schwann mediante la inmunotinción del marcador S-100. D) Inmunodetección del marcador GAP-43 para evaluar las nuevas fibras nerviosas generadas. E) Las fibras nerviosas maduras generadas se mostraron mediante tinción inmunohistoquímica de neurofilamentos (NFL). Barra de escala = 50 nm.

3.2.3 Resultados histomorfométricos y ultraestructurales de la regeneración nerviosa

Se realizó un análisis histomorfométrico y ultraestructural de la parte distal de los nervios ciáticos operados tras un periodo de curación de 15 semanas (Fig. 19) y los parámetros estereológicos se resumen en la Tabla 10. Las imágenes histológicas (Fig. 19.A) mostraron la presencia de fibras nerviosas regeneradas en todos los grupos operados. Cuando se evalúan las imágenes con azul de toluidina, se observa que se presenta una mayor cantidad de fibras, pero de menor diámetro en todos los grupos cuando se comparan con el CTR (Fig. 19.A.1). Así, entre los grupos operados, los métodos AUTO y P2 presentaron mayor número de fibras que P1 y SD. Además, el grupo SD mostró la menor cantidad de fibras y respuesta celular inflamatoria entre ellos. Estas observaciones fueron corroboradas con el análisis MET (Fig. 19.A.2), que también mostró un grosor de mielina superior en AUTO y P2 que en P1 y SD, pero no comparable con el grupo CTR. Además, las imágenes de mayor aumento permitieron observar la red de colágeno endoneural bien organizada en todos los grupos y un mayor número de fibras no mielinizadas en AUTO así como en el grupo CTR.

En relación con la evaluación histológica cuantitativa de la regeneración nerviosa (Figura 19.B y Tabla 10), los diferentes grupos operados mostraron una densidad y un número total de fibras nerviosas superiores que presentaban un diámetro menor y vainas de mielina más finas. Así, AUTO ($20,26 \pm 2,57$ fibras $\cdot 10^3/\text{mm}^2$) y P2 ($22,31 \pm 2,45$ fibras $\cdot 10^3/\text{mm}^2$) presentaron una densidad de fibras significativamente mayor ($p < 0,05$) que CTR ($12,99 \pm 2,53$ fibras/ mm^2) en contraste con SD ($10,27 \pm 3,12$ fibras $\cdot 10^3/\text{mm}^2$) y P1 ($17,45 \pm 2,30$ fibras $\cdot 10^3/\text{mm}^2$), en los que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$). Además, el grupo AUTO mostró el mayor número total de fibras ($16,64 \pm 2,83$ fibras $\cdot 10^3$) y fue el único grupo que fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo CTR. Además, el grupo de SD presentó valores significativamente inferiores en

densidad y número total de fibras ($p < 0,05$) que los otros grupos operados. Por otro lado, se encontraron valores significativamente menores ($p < 0,05$) en el diámetro de los axones y de las fibras y en el grosor de la mielina entre CTR y todos los grupos de animales operados. Además, AUTO ($0,58 \pm 0,05 \mu\text{m}$) presentó un grosor de mielina significativamente mayor que P1 ($0,47 \pm 0,04 \mu\text{m}$) y P2 ($0,47 \pm 0,03 \mu\text{m}$) pero curiosamente no lo hizo con el grupo de SD ($0,49 \pm 0,18 \mu\text{m}$). Por último, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la relación g entre las distintas condiciones experimentales.

Tabla 10: *Parámetros histomorfométricos medidos en la parte distal del injerto a las 15 semanas después de la reparación nerviosa.*

	Densidad (Nº axones $\cdot 10^3/\text{mm}^2$)	Nº Total de fibras ($\cdot 10^3$)	Diámetro de axon (μm)	Diámetro de fibra (μm)	Espesor de mielina (μm)	G-ratio
CTR	$12,99 \pm 2,53$	$8,71 \pm 0,74$	$5,33 \pm 0,84$	$8,39 \pm 0,82$	$1,53 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,04$
AUTO	$20,26 \pm 2,57$	$16,64 \pm 2,83$	$2,33 \pm 0,36$	$3,50 \pm 0,35$	$0,58 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,04$
SD	$10,27 \pm 3,12$	$2,69 \pm 1,61$	$2,17 \pm 0,48$	$3,15 \pm 0,83$	$0,49 \pm 0,18$	$0,68 \pm 0,02$
P1	$17,45 \pm 2,30$	$8,39 \pm 1,18$	$2,48 \pm 0,66$	$3,42 \pm 0,65$	$0,47 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,05$
P2	$22,31 \pm 2,45$	$10,92 \pm 4,88$	$2,11 \pm 0,21$	$3,06 \pm 0,20$	$0,47 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,02$

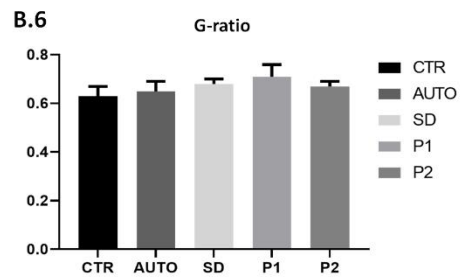
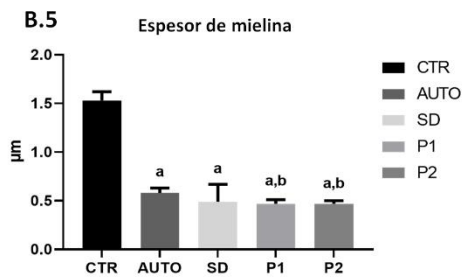
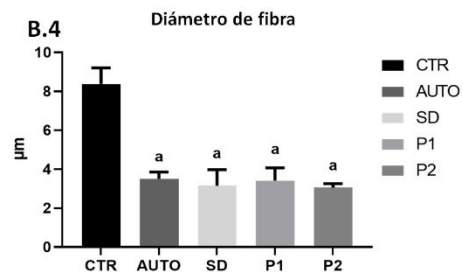
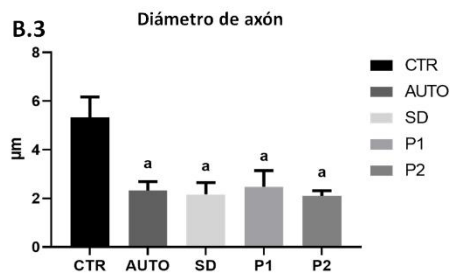
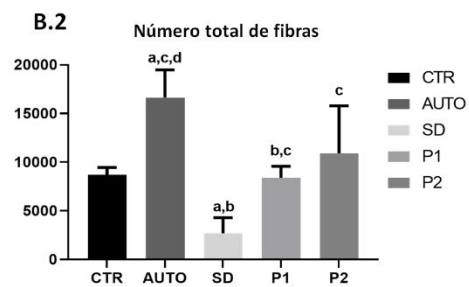
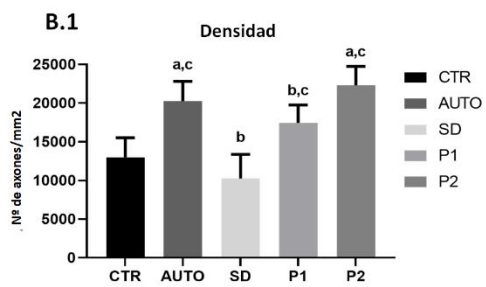
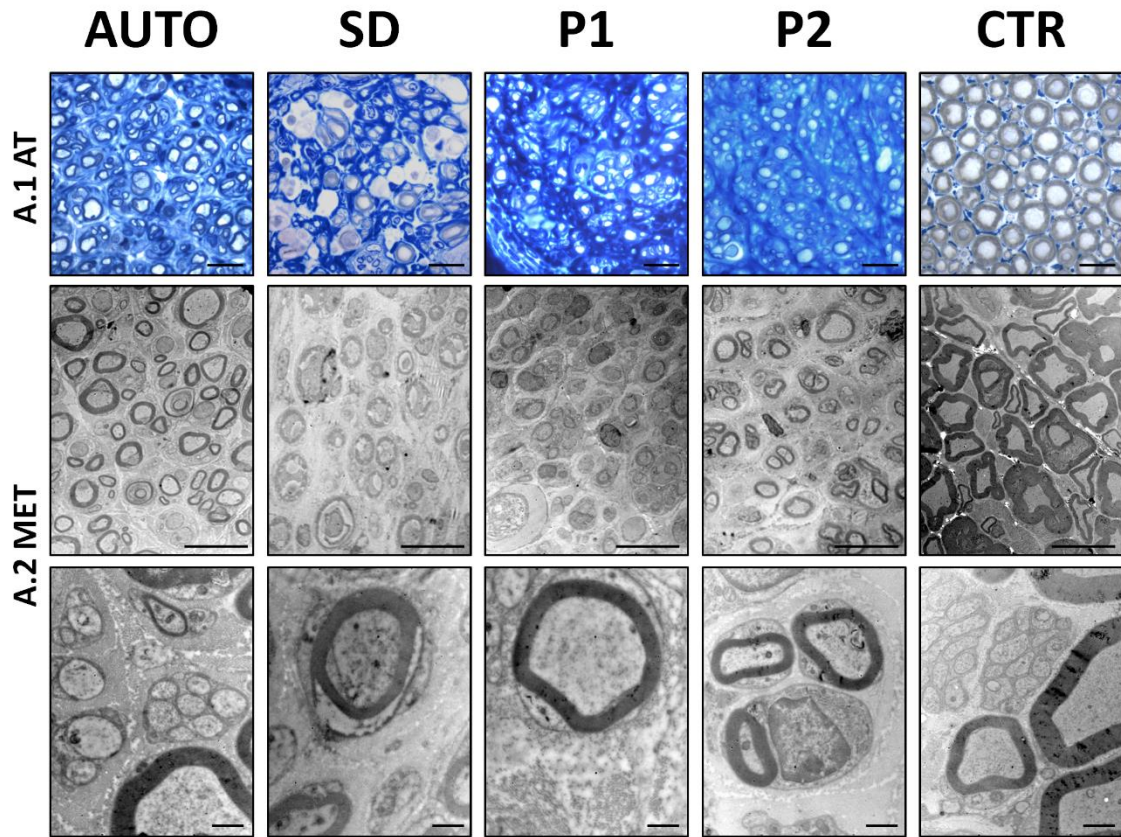


Figura 19: Evaluación cuantitativa y ultraestructural de la regeneración nerviosa en la región distal del injerto. A.1) Evaluación de la morfología general mediante tinción con azul de toulidina (TB). A.2) Imágenes TEM representativas de una sección transversal. Barra de escala: A.1) = 20 μm ; A.2) = 10 nm imágenes de bajo aumento y 1 nm imágenes de alto aumento. B) Se realizó una histomorfometría cuantitativa de los ANDs. B.1) Densidad de fibras; B.2) Número total de fibras; B.3) Diámetro del axón; B.4) Diámetro de la fibra; B.5) Espesor de la mielina; B.6) Relación G (diámetro del axón/diámetro de la fibra).

VIII DISCUSIÓN

La IT ha evolucionado exponencialmente en los últimos años, fabricando sustitutos cada vez más biomiméticos con fines de investigación y especialmente terapéuticos. A pesar de los avances técnicos en los diferentes procesos de biofabricación por IT, la generación de tejidos y órganos complejos, tales como los nervios periféricos, no ha sido posible debido a su complejidad estructural y molecular, por lo que siguen siendo un desafío en este campo.

En este contexto, la generación de sustitutos nerviosos descelularizados ha surgido como una alternativa prometedora en la IT neural. Gracias a este tipo de estrategias se obtienen sustitutos con una MEC específica del tejido a reparar, no inmunogénicas. Además, esto permite obtener una matriz 3D que mantiene (en condiciones ideales) las propiedades estructurales, bioquímicas y biológicas del tejido nativo. Todo esto contribuye a que estos biomateriales proporcionen un microambiente óptimo para la regeneración neural. Sin embargo, todo proceso de descelularización conlleva una alteración de la estructura y/o composición de la MEC, pudiendo llegar a comprometer las propiedades estructurales, biomecánicas y/o biológica de los mismas [47].

Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral se han abordado dos principales estrategias para la generación de nuevos sustitutos de nervio periférico mediante IT que mantengan las propiedades biológicas nativas del nervio y puedan servir de fuente alternativa a la reparación quirúrgica de nervios periféricos. En primer lugar, se evaluaron los efectos que tiene el entrecruzamiento con el agente químico natural genipín en sustitutos de nervio descelularizados con un método previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación (RS) [98]. Este estudio ha tenido por objetivo mejorar las propiedades biomecánicas y estructurales de los sustitutos generados, e incluso con posibles propiedades antiinflamatorias tras el injerto [166]. En segundo lugar, se desarrollaron tres nuevos métodos de descelularización con el fin de mejorar los resultados de los estudios previos, ya que el método de RS no se logró eliminar, de forma eficiente, el contenido de mielina [98]. Estos métodos fueron caracterizados a nivel *ex vivo*, y se evaluó la eficiencia terapéutica *in vivo*.

Es importante poner de relieve la importancia que representa el problema de las lesiones de nervio periférico en nuestra sociedad actual. La incidencia estimada

de las lesiones traumáticas de NP es de más de 300.000 casos al año en Europa [210] y más de un millón al año en todo el mundo [43]. La gran extensión de los NP los hace vulnerables a una amplia gama de lesiones traumáticas [12]. Las lesiones traumáticas más comunes son las compresiones, tracciones, laceraciones, transecciones (incompletas o completas), o la avulsión de las raíces nerviosas [43,67]. Además, la disección quirúrgica de cánceres primarios o metastásicos también puede afectar gravemente a la estructura y la función de los NP, creando defectos complejos que deben ser reparados [211].

Como ya ha sido descrito en la presente Tesis Doctoral, la reparación directa del nervio periférico es el tratamiento preferido en los defectos nerviosos cortos, y el autoinjerto nervioso es la técnica *gold standard* para la reconstrucción de lesiones graves [12]. Sin embargo, esta técnica es eficaz en aproximadamente el 50% de los casos y existen varios inconvenientes, bien conocidos, que limitan su uso.

El tratamiento de las lesiones de los nervios periféricos sigue siendo una cuestión parcialmente resuelta en la cirugía reconstructiva y los sustitutos artificiales, especialmente los ANDs, aparecen como una de las alternativas más prometedoras en este campo [95,96]. En este contexto, el objetivo de este estudio fue generar nuevos ANDs biocompatibles con propiedades biomecánicas y estructurales mejoradas. Para ello, se generaron ANDs utilizando métodos de descelularización previamente descritos en la literatura científica SD y RS, los cuales fueron posteriormente tratados con GP como agente químico entrecruzante. Este trabajo es uno de los primeros en los que se ha utilizado el GP como agente químico para mejorar las propiedades biomecánicas de los nervios descelularizados y, por lo tanto, se llevó a cabo una completa caracterización *ex vivo* de sus propiedades histológicas, ultraestructurales, biomecánicas y biológicas.

El éxito de las técnicas de descelularización, en comparación con los procesos convencionales de biofabricación de IT, radica en la posibilidad de generar matrices acelulares no inmunogénicas, biocompatibles y pro-regenerativas de tejidos específicos [91]. Sin embargo, está bien documentado que los métodos de descelularización tienen un impacto irreversible en la composición molecular

e incluso en la estructura de la MEC restante [47,96,98]. En el caso de los ANDs, el método de SD es uno de los más utilizados para este fin, se considera un método clásico y de referencia en la literatura [96]. Esta técnica basada en detergentes combina el uso de desoxicolato de sodio (SDC) al 4% y Tritón X-100 al 3%, lo que da como resultado una lisis celular y una preservación de la MEC relativamente eficientes, presentando además una alta biocompatibilidad *in vivo* y una óptima regeneración del tejido nervioso [95,96]. Más recientemente, nuestro grupo de investigación introdujo el método de RS, utilizado originalmente en la descelularización de tejido cardíaco [196], para generar ANDs. Esta técnica combina el 1% de Tritón X-100 con un tratamiento enzimático (ADNasa, ARNasa y tripsina), lo que da como resultado una descelularización y una preservación de la MEC más eficientes que el procedimiento convencional de SD [98].

En este caso, la determinación del contenido de ADN, la histología y los análisis mediante microscopía electrónica de barrido confirmaron las diferencias entre los métodos SD y RS. En efecto, la técnica de RS dio lugar a un menor contenido de ADN, y por tanto una descelularización más eficiente. Además, el método de RS mostró una mejor preservación de la estructura de la MEC, estando estos nuevos hallazgos en concordancia con estudios anteriores [95,98]. En el presente trabajo, el tratamiento químico de los ANDs SD y RS con GP no presentó cambios histológicos o ultraestructurales notables obteniendo en ambos casos un patrón histológico 3D bien conservado. Además, los análisis DAPI e inmunohistoquímicos (S-100, VIM y NFL) confirmaron con precisión la eficiente eliminación del ADN y de los restos celulares. Curiosamente, la histología reveló una reacción azulada (debida al uso de GP) en el compartimento endoneural de los grupos RS-GP, especialmente en RS-GP 0,25%, pero esta reacción no se produjo en ningún grupo SD-GP. Estos resultados están probablemente relacionados con una mejor preservación de la MEC en los grupos RS y, en particular, con la presencia de restos de mielina que se confirmaron mediante el método histoquímico MCOLL y los análisis mediante MEB. Estos restos de mielina probablemente inducirán el reclutamiento de macrófagos para eliminar estos restos iniciando un proceso complejo (que podría llevar semanas) que podría retrasar la regeneración del tejido nervioso [50,53]. Probablemente, la presencia de restos de mielina podría ser una explicación de por qué el uso de

RS-ANDs en la reparación de nervios fue comparable, pero no superior, a la técnica de autoinjerto [95]. Otros estudios deberán determinar las implicaciones de la presencia de restos de mielina dentro de los nuevos RS ANDs entrecruzados con GP en la reparación de nervios.

En cuanto a los análisis histoquímicos y cuantitativos de la MEC, la tinción AB demostró una reducción significativa, pero beneficiosa, de los proteoglicanos con los métodos SD y RS. Aunque confirma una alteración de la MEC restante, en el caso de los ANDs es importante eliminar estas moléculas no fibrilares, generalmente mediante el uso de condroitinasa ABC [96]. Es generalmente conocido que los proteoglicanos ricos en GAGs del tipo condroitín sulfato pueden obstaculizar las señales de la MEC, esenciales para la función celular, como la glicoproteína laminina, lo que puede provocar una disminución, retraso o incluso una inhibición de la regeneración del tejido nervioso [40,96,212]. Además, el uso de GP redujo la reacción histoquímica de los proteoglicanos. Probablemente, el GP fue capaz de interactuar químicamente con los proteoglicanos presentes en la MEC reduciendo los sitios de unión para el colorante catiónico AB. El análisis histoquímico y cuantitativo de la red de colágeno, realizado con tinción histoquímica de PS, también demostró una reducción significativa y una organización tridimensional de estas fibras de ECM en los ANDs en comparación con la condición nativa. La reducción fue más evidente con el uso del procedimiento RS y el entrecruzamiento con GP no dio lugar a cambios histoquímicos y ultraestructurales dignos de mención. Como se ha mencionado anteriormente, la laminina juega un papel clave durante la regeneración del nervio periférico, esta glicoproteína de la membrana basal apoya la migración de las CS, la proliferación y el proceso de crecimiento axonal [33,213]. Por lo tanto, se recomiendan métodos de descelularización que preserven adecuadamente estas glicoproteínas [40]. En este estudio, el análisis inmunohistoquímico de la laminina demostró que el procedimiento de RS dio lugar a una preservación y organización tridimensional de esta glicoproteína en el compartimento endoneural considerablemente mejor que el procedimiento de SD, no viéndose afectado por el tratamiento posterior con GP.

Desde el punto de vista estructural y/o molecular, nuestros nuevos ANDs tratados con GP, especialmente los generados con el método RS, podrían

proporcionar señales físicas y moleculares para el microambiente regenerativo del nervio, además de facilitar su manipulación e implantación durante la reconstrucción del nervio [40,47,96,212]. En este estudio, el ensayo de tracción confirma que los nervios nativos son órganos biomecánicamente delicados y sus propiedades biomecánicas se vieron moderadamente afectadas por ambos procedimientos de descelularización, especialmente los generados con el método SD, que eran más rígidos como se demostró previamente [98].

Para compensar el detrimento biomecánico causado por el proceso de descelularización, los ANDs de SD y RS fueron entrecruzados con GP. Este compuesto es un glucósido iridoide natural aislado del fruto de *Gardenia Jasminoides* [214] y a menudo utilizado para mejorar las propiedades biomecánicas de los biomateriales en TE [30,156], incluyendo los conductos guía para la reparación de nervios [166].

En este sentido, el uso de GP en los ANDs resultó en una mejora significativa de la resistencia biomecánica a la fractura manteniendo un rango adecuado de propiedades viscoelásticas (Módulo de Young) y de deformación (tensión a la fractura y extensión). Estos resultados de los RS ANDs entrecruzados con GP fueron considerablemente más favorables y comparables a los de los nervios nativos, donde no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas concentraciones de GP utilizadas. Además, nuestros resultados sugieren una relación entre el grado de preservación de la MEC y las propiedades biomecánicas de los ANDs generados. De hecho, en el caso de SD, el aumento de la rigidez podría atribuirse al uso de del detergente SDC, que disminuyó considerablemente el contenido de proteoglicanos y, por tanto, la tasa de hidratación de los mismos, pero preservó una red de colágeno abundante. En este contexto, el GP podría reaccionar espontáneamente con los grupos aminos primarios de las fibras de colágeno restantes a través del mecanismo de entrecruzamiento de imidas, como se sugirió anteriormente [215,216]. Además, la caracterización a la tracción de nuestros ANDs registró valores biomecánicos considerablemente mejores que otros sustitutos nerviosos generados mediante IT por nuestro grupo de investigación [33]. Desde el punto de vista biomecánico, nuestros resultados sustentan la idea de que nuestros novedosos ANDs de RS entrecruzados con GP tienen un rango de propiedades biomecánicas muy

similares a las de los nervios nativos, lo que los hace adecuados para su potencial uso en la reparación nerviosa. No obstante, y a pesar de los resultados positivos, es necesario optimizar nuevos protocolos que logren eficazmente eliminar el componente celular y mielínico característico del tejido nervioso.

En la actualidad, los avances técnicos en IT permiten diseñar y generar sustitutos 3D muy complejos para la reparación y sustitución de tejidos. Sin embargo, la mayoría de ellos se basan en el uso de biomateriales sintéticos que son menos biocompatibles y carecen de propiedades pro-regenerativas [217]. En este contexto, los ANDs están compuestos por una MEC natural con moléculas pro-regenerativas bien conocidas, como el colágeno y la laminina, que no se vieron afectadas estructuralmente por el tratamiento con GP. En general, el uso de agentes citotóxicos durante el proceso de descelularización podría tener un impacto en la biocompatibilidad de los ANDs [40,47]. En este estudio comparativo, los análisis de la interacción célula-biomaterial confirmaron que un alto número de rADMSCs viables y metabólicamente activas fueron capaces de adherirse, crecer y adquirir una morfología alargada dentro de nuestros ANDs. Se obtuvieron resultados aún mejores cuando los ANDs se generaron con el método RS, estando estos resultados en concordancia con los hallazgos histológicos y hematológicos previos de un reciente estudio *in vivo* [95]. El tratamiento con GP, disminuyó ligeramente la viabilidad celular y la funcionalidad de las rADMSCs cultivadas dentro de estas matrices, particularmente cuando se utilizó el 0,25% de GP. A pesar del impacto del GP en la funcionalidad celular, los resultados generales fueron considerablemente aceptables y mejores cuando los RS-ANDs fueron entrecruzados con 0,10% de GP. Estos análisis señalan que el método de descelularización es un factor determinante en las propiedades de biocompatibilidad de los ANDs generados, que puede verse afectado además por el agente de reticulación utilizado. La reducción de las propiedades biológicas de los ANDs entrecruzados puede estar relacionada con los cambios moleculares inducidos por el GP en la MEC remanente (reducción de los sitios de interacción célula-MEC) o con cierto grado de citotoxicidad. En este sentido, podrían ser necesarios más estudios para determinar si esto se debe a un efecto citotóxico del GP o si las células necesitan un periodo de adaptación más largo para poder crecer dentro del nuevo microambiente 3D, como se ha observado

tras la modificación de las propiedades estructurales de otros biomateriales [36]. No obstante, el uso potencial de estos nuevos ANDs entrecruzados con GP en la reparación de nervios está respaldado por estudios anteriores en los que los biomateriales entrecruzados con GP se utilizaron con éxito *in vivo*, presentando un grado aceptable de biocompatibilidad y regeneración de los tejidos tratados [151,157,165,218].

Basándonos en los resultados generales obtenidos en este estudio, planteamos la hipótesis de que nuestros ANDs entrecruzados con GP podrían representar una alternativa prometedora en la reparación de nervios. Estos nuevos sustitutos, al igual que los ANDs convencionales, podrían generarse a partir de una amplia gama de nervios donantes. Además, el uso de GP podría mejorar la bioestabilidad de estos ANDs generados, como se demostró previamente en otros tejidos descelularizados [159,219,220] y mantenerse almacenados en condiciones estériles hasta su uso, solventando dos desventajas presentadas por los autoinjertos, la disponibilidad de material y las necesidades anatómicas del injerto [42].

En comparación con los aloinjertos nerviosos, que tienen un alto riesgo de rechazo o respuesta inmunológica, nuestros ANDs son considerablemente menos inmunogénicos debido a su eficaz grado de descelularización. Además, el tratamiento posterior con GP, podría proporcionar propiedades antiinflamatorias a nuestros injertos, como han demostrado previamente otros autores [165,166]. Además, los ANDs entrecruzados tienen mejores propiedades biomecánicas en comparación con las convencionales, lo que las hace más fáciles de manipular y suturar. Una vez implantados, su mayor resistencia y su adecuada flexibilidad podrían ayudar a reducir el daño biomecánico a los tejidos en regeneración y circundantes, a menudo causado por los dispositivos biomédicos rígidos [12,221], Además, sus propiedades viscoelásticas podrían disminuir el riesgo de tensión, rotura o compresión postquirúrgica que se ha observado con el uso de conductos nerviosos [198,222].

Estos nuevos ANDs, especialmente los generados con el protocolo de RS y tratados con GP, están compuestos por una ECM natural específica del tejido con una red de colágeno bien conservada y tubos endoneurales compuestos por

laminina y colágeno que apoyan su futuro uso en la reparación y regeneración de nervios. Además, las mejoras obtenidas con el GP podrían contribuir a mejorar la estabilidad física, estructural y/o biológica de los ANDs una vez almacenados. No obstante, todavía es necesario determinar las condiciones óptimas de almacenamiento a largo plazo de estos productos terapéuticos.

A pesar de los resultados positivos conseguidos con el protocolo de RS, su evaluación de regeneración *in vivo* no logró superar la eficacia del autoinjerto, pudiendo deberse a la ineficiente eliminación de mielina por este método [95]. Por ello, en nuestro grupo de investigación creímos en la necesidad de optimizar otros protocolos de descelularización que pudieran solventar este problema preservando la MEC y sus biomoléculas esenciales para la regeneración como es el caso de la laminina.

En este sentido, en el segundo estudio se presenta una caracterización histológica, ultraestructural, bioquímica, biomecánica y de biocompatibilidad de los AND con tres nuevos métodos de descelularización se compararon con el método clásico de SD [96], como se hizo en el estudio anterior. Estos métodos tienen por objetivo mejorar los resultados obtenidos por el método desarrollado previamente (RS).

Es por ello, que en este trabajo intentamos optimizar el proceso de descelularización del nervio utilizando diferentes concentraciones del detergente no iónico Tritón X-100 y de los detergentes iónicos SDS y SDC, con el fin de destruir y eliminar el material celular y los glicosaminoglicanos de condroitín sulfato, que interfieren negativamente en el proceso de regeneración axonal [109], causando el mínimo impacto en la MEC. Dichos detergentes se utilizaron en combinación con una mezcla enzimática (ARNasa y ADNasa) o una solución de ácido peracético (PAA) al 3%, en el caso del método P3, para intentar eliminar los restos de ácido nucleico que pudieran producir una respuesta inmune.

En primer lugar, como se hizo anteriormente, el objetivo principal de la descelularización de tejidos es generar matrices naturales que no sólo no presenten material nuclear, sino que tampoco contengan restos citoplasmáticos. Por lo tanto, la eficacia de los diferentes métodos de descelularización se

confirmó mediante varios ensayos histoquímicos (HE, DAPI, MCOLL), inmunohistoquímicos (S-100, NFL y VIM), ultraestructurales (MEB y MET) y de cuantificación del ADN. Los resultados del contenido de componentes celulares en todas estas evaluaciones fueron en general satisfactorios en los métodos novedosos (P1, P2 y P3) y en el clásico (SD), excepto en el caso de la proteína citoesquelética NFL, que se conservó parcialmente después de todos los procedimientos de descclularización, lo cual se explica por su alta resistencia a la degradación por detergentes [223]. Sin embargo, SD fue el único grupo que presentó señales positivas visibles de restos de ADN en la tinción con DAPI y este hecho estuvo en concordancia con el valor significativamente mayor obtenido en la extracción y cuantificación de ADN en comparación con los otros grupos descclularizados. Además, observando los resultados de la extracción de ADN, el intento de sustituir el uso de nucleasas por otros reactivos más baratos como el PAA en P3, que podría proporcionar una ventaja sustancial en la posterior producción a escala industrial, no logró la eficacia de las enzimas cuando se comparó con el método análogo P2, pero tampoco cuando se comparó con el método de descclularización más suave P1. Esta disminución significativa del contenido de ADN, utilizando incluso un protocolo menos agresivo con menor concentración de detergentes, puso de manifiesto la importancia en el uso de la enzima en los procedimientos de descclularización como se ha descrito anteriormente [97,120]. Otro aspecto a tener en cuenta es la eficiente eliminación de mielina en todos los grupos experimentales observada en el método MCOLL y confirmada por las imágenes ultraestructurales de MEB, que fue uno de los principales aspectos de mejora respecto al anterior método de descclularización de Roosens et al. [98] y que podría tener un efecto inhibitorio en la regeneración axonal [95,170].

En segundo lugar, se evaluó el impacto de los procedimientos de descclularización en la conservación de la MEC y las biomoléculas con importante relevancia en la regeneración. La evaluación de los sGAGs mostró una disminución significativa en la histología cuantitativa en las capas endoneurales y peri-epineurales y también en el ensayo bioquímico Blyscan después de los procedimientos de descclularización en P2, P3 y especialmente en SD, pero no en el P1. Este hecho, podría explicarse debido a la mayor

concentración de SDC utilizada en los grupos mencionados en comparación con el P1, tal y como se hipotetizó previamente [98]. Esta eliminación de proteoglicanos como el condroitín sulfato está bien referenciada como beneficiosa para el crecimiento axonal y la regeneración nerviosa, así como la preservación de la otra proteína no fibrilar laminina [40,96,212] que presentó una mejor conservación en los tres nuevos protocolos probados que el grupo SD. En referencia a la estructura colágena de la MEC resultante tras la descelularización, la evaluación histoquímica del PS mostró una considerable buena conservación de la red fibrilar 3D en las diferentes capas histológicas en todos los grupos descelularizados, excepto en P3 en el que la estructura colágena sufrió un fenómeno de condensación que se correspondió con una tinción más intensa en las capas externas. Este fenómeno de condensación en P3 fue también evidente en el engrosamiento de los tubos endoneurales en las imágenes de MEB, por lo que hipotetizamos que podría ser producido por la desnaturalización ácida de la estructura de colágeno por el paso de PAA al 3%. Además, las imágenes ultraestructurales de MET mostraron la destrucción del colágeno endoneural en los grupos P3 y SD, mientras que P1 y P2 presentaron una mejor conservación.

En tercer lugar, la eliminación de ciertos componentes de la MEC por los diferentes procedimientos de descelularización podría estar asociada a cambios en las propiedades físicas de los ANDs generados. El ensayo de transparencia reveló macroscópicamente que el grupo SD fue el que más componentes perdió en comparación con los otros grupos descelularizados y presentó los valores más altos (aunque no de manera significativa) de rigidez en el ensayo de tracción (tensión a la rotura y módulo de Young). Este hecho, al igual que en estudio anterior, podría explicarse por la eliminación de los proteoglicanos altamente hidratados como los sGAGs. Así pues, es importante destacar que los ANDs obtenidos con nuestros novedosos métodos no se diferenciaron de los nervios nativos en los resultados biomecánicos obtenidos.

Como se ha descrito previamente, el uso de agentes citotóxicos como detergentes durante la descelularización podría tener un efecto negativo en la biocompatibilidad de los sustitutos generados. En este trabajo, los ensayos de citocompatibilidad determinaron que los diferentes ANDs producidos son

capaces de promover la adhesión, el crecimiento de numerosas rADMSCs viables y metabólicamente activas que presentan una morfología estrellada.

En resumen, en este segundo estudio realizamos una extensa caracterización *in vitro* de tres protocolos novedosos que posteriormente se utilizaron para reparar una lesión nerviosa o de 10 mm de nervio ciático de rata y comparados con el método de descelularización clásico de SD. Todos los ANDs generados presentaron una eficiente eliminación de material celular y mielina, una lámina basal de laminina bien conservada y una red de colágeno (excepto P3) sin alteración significativa de los parámetros biomecánicos y buenas propiedades de biocompatibilidad. Debido a esto, protocolo P3 fue descartado para el estudio de regeneración *in vivo*.

Por tanto, el último estudio presentado en esta Tesis Doctoral se corresponde con la evaluación *in vivo* de la eficacia de regeneración nerviosa de los nuevos AND generados mediante los métodos P1 y P2 mediante análisis clínico-funcional, hematológico, morfométrico muscular, histológico, histomorfométrico y ultraestructural. Además, en este estudio se compararon los resultados de las diferentes pruebas con el método clásico SD y con el autoinjerto (AUTO) como técnica actual de referencia.

Las evaluaciones clínicas y funcionales son una piedra angular en el control de calidad de la regeneración de los nervios periféricos [12,202]. En general, el nervio ciático de la rata, como modelo de regeneración, se asocia al deterioro funcional que suele desarrollar un grado variable de autotomía, desde la simple pérdida de la uña hasta la mutilación extensa de todo el pie [224]. En este trabajo, el porcentaje de animales que presentaron una o más amputaciones fue consistente con el porcentaje total de dedos amputados en todos los grupos, siendo el AUTO y el P2 los grupos que presentaron menor grado de autotomía siguiendo por el P1 y el SD. Según la literatura, la autotomía podría estar relacionada con un mayor desarrollo de parestesias y pérdida sensorial [224-226]. En consecuencia, en nuestro estudio no sólo el grado de autonomía observado en los grupos operados parece estar inversamente correlacionado (pero no significativamente) con la recuperación sensorial obtenida por la prueba del pellizco, sino también con un mejor resultado de la extensión motora de los

dedos. Sin embargo, en el caso del test SFI de recuperación motora esta tendencia no es tan clara, mostrando una recuperación parcial en todos los animales operados y obteniendo los mejores resultados en P2 siguiendo al grupo AUTO, pero no siendo comparable con el grupo control sano como se esperaba. Estos resultados del SFI de recuperación motora de P2 fueron ligeramente superiores a los de otros métodos de descelularización, como nuestro estudio anterior con el método Roosens [95] y Liu et al. [227]. Sin embargo, algunos animales fueron excluidos de la prueba SFI debido a que su autotomía no permitía realizar esta prueba. Este hecho es uno de los principales inconvenientes relacionados con el modelo de lesión ciática que puede interferir en la interpretación de los resultados de los ensayos de recuperación funcional [96,202,224]. En definitiva, nuestros resultados sugieren que la presencia de la autotomía podría estar relacionada con una menor recuperación sensitiva y motora y, por tanto con la regeneración del tejido nervioso.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la generación de sustitutos de bioingeniería por ingeniería tisular, es el objetivo de producir la mínima respuesta inmunitaria del huésped tras la implantación quirúrgica, que podría interferir en la velocidad y eficiencia de la regeneración y recuperación funcional [12,38]. En este caso, el aloinjerto descelularizado podría producir una respuesta inmunitaria del huésped por una eliminación incompleta del material celular o por la presencia de restos químicos residuales, como residuos enzimáticos, detergentes o ácidos utilizados en la descelularización o en el procedimiento de esterilización posterior [40,47]. Por lo tanto, en este estudio se realizó un análisis hematológico como método preciso y cuantitativo contrastado para evaluar la respuesta inmunitaria del huésped en el trasplante de órganos como los injertos de nervios periféricos [207]. La evaluación analítica de los resultados de las células sanguíneas como los eritrocitos (RBC, HGB y MCV) presentó un aumento leve pero no significativo en todos los grupos de ANDs en la mayoría de los parámetros como se ha descrito previamente [95], a excepción del HGB que disminuyó significativamente en SD y AUTO respecto al grupo CTR que podría estar asociado a la respuesta fisiológica del huésped a las intervenciones quirúrgicas. En el caso de los parámetros leucocitarios (WBC, LYM, MXD, y NEUT), las únicas diferencias significativas entre los grupos CTR y los operados

fueron una disminución del MXD y un aumento del porcentaje de NEUT en los grupos AUTO y P2 que observando el resultado clínico-funcional, histológico e histomorfométrico podría estar asociado a la remodelación tisular activa en el propio proceso de regeneración.

Además, se evaluó el perfil bioquímico de los diferentes grupos de estudio para tratar de identificar afecciones o disfunciones orgánicas o sistémicas tras el implante de los ANDs utilizados. En este estudio no hubo diferencias significativas entre los resultados de los grupos operados y del CTR en los parámetros asociados al hígado, riñón, lípidos y páncreas, lo que sugiere que los ANDs utilizados son biocompatibles y seguros para ser implantados.

Por último, la enzima creatina quinasa (CK) se utiliza habitualmente como indicador de disfunción o daño muscular, pero la reducción de la CK en los plasmas por debajo de los valores normales podría estar asociada a la reducción de la masa muscular [228]. Por lo tanto, la disminución significativa de los valores de CK de AUTO y P2 respecto al grupo CTR podría estar asociada a la reducción de masa muscular antes mencionada, mientras que los de SD y P1 no podrían diferir del grupo CTR debido a un posible aumento de la enzima producida por el músculo dañado que no se regenera y que compensa los niveles de enzima generados por la atrofia en estos grupos. No obstante, existen pocos datos publicados al respecto y es preciso realizar más investigaciones relacionadas con las variaciones en los valores de CK en sangre y su relación con el proceso de regeneración neural periférica.

La evaluación de la recuperación de la función muscular es una de las principales valoraciones del progreso de la regeneración nerviosa. La falta o la incompleta inervación fisiológica en el músculo provoca pérdida de peso y funcionalidad, también llamada atrofia [96]. En consecuencia, un aumento del peso y la tensión del músculo muestra la adecuada reinervación del injerto, que es capaz de transmitir estímulos eléctricos al músculo objetivo [229]. En nuestro estudio, todos los grupos operados sufrieron una evidente pérdida de peso general en el lado de la lesión que puede analizarse en detalle tras la evaluación de los principales músculos inervados por el nervio ciático en cada grupo, el gastrocnemio y el tibial anterior. La menor atrofia en todas las mediciones realizadas se mostró en el

grupo AUTO, como era de esperar, siendo significativamente diferente a todos los grupos ANDs. Sin embargo, no se encontraron otras diferencias significativas entre los grupos descelularizados, obteniéndose resultados comparables entre ellos.

La histología se considera uno de los controles de calidad más útiles y precisos en la regeneración del tejido nervioso tras la reparación del nervio periférico, incluida la evaluación de la regeneración axonal a lo largo de los sustitutos descelularizados [12,58]. En este estudio, las evaluaciones histológicas confirmaron evidentemente un proceso de regeneración del tejido nervioso consistente y activo en la parte central de todos los nervios operados después de 15 semanas. En todos los grupos del estudio, se observaron diferentes grados de remielinización mediante el método histológico MCOLL, que confirma la interacción funcional Schwann- axón [53], y esa información fue corroborada con la detección de inmunotinción de CS (S-100) y de axones maduros regenerados (NFL). En cuanto al patrón histológico, el proceso de regeneración nerviosa se desarrolló de forma más compartimentada en los grupos AND, siendo más evidente la generación de conos de regeneración separados en los grupos SD y P1 mientras que el grupo AUTO presentó una organización más homogénea. De hecho, el colágeno endoneurial teñido en el método MCOLL sugirió la presencia de tejido fibrótico en el grupo SD que podría afectar al crecimiento axonal como se ha descrito previamente [95]. Además, el grupo P2 fue el que presentó un patrón de regeneración más similar al del grupo AUTO, evaluando la distribución de la señal positiva de mielina, NFL y S-100, pero no comparable con los nervios sanos, donde el tamaño de los axones y las vainas de mielina eran superiores.

El análisis histomorfométrico se ha convertido en uno de los controles de calidad clave para determinar de forma objetiva y cuantitativa la eficacia de la regeneración nerviosa de las diferentes estrategias utilizadas en la reparación de los nervios periféricos [58,230]. En este estudio se evaluó la cuantificación de los parámetros nerviosos más utilizados en la parte distal para valorar cómo transcurría el proceso de regeneración de los diferentes injertos utilizados. De hecho, todos los grupos operados presentaron los fenómenos de microfasciculación convencionales con una mayor densidad y número de fibras nerviosas pero con menor diámetro y vainas de mielina más finas que los nervios

sanos, como se desarrolla comúnmente después de una lesión nerviosa periférica [53,96,230,231]. Los nuevos métodos descelularizados generados (P1 y P2) presentaron resultados significativamente superiores en densidad y número total de fibras al grupo SD clásico, pero sólo P2 presentó resultados similares al grupo AUTO. Sin embargo, el nuevo axón y la fibra generada no adquirieron el diámetro previo a la lesión como se esperaba. [230,231]. Estas observaciones estaban en correlación con las imágenes MET de la parte distal del injerto. Además, las imágenes de azul de toluidina del grupo SD mostraron una infiltración inflamatoria en la parte endoneural, nuestra hipótesis es que este efecto podría ser producido por los residuos citoplasmáticos y de mielina observados en las imágenes de MET en la caracterización *in vitro* previa o por restos químicos debido a la alta concentración de los detergentes utilizados.

En resumen, en función de la caracterización previa *ex vivo*, se seleccionaron P1 y P2 para evaluar su eficacia regenerativa y compararla con las técnicas de SD y autoinjerto en una lesión ciática crítica de rata de 10 mm después de 15 semanas. Todos los grupos operados presentaron una recuperación motora y sensitiva parcial, como era de esperar debido al tiempo de análisis, que estuvo en correlación con los resultados histológicos, histomorfométricos y ultraestructurales de la regeneración nerviosa. Finalmente, los resultados globales confirman que el protocolo P2 fue el más eficiente, con un perfil comparable, pero no superior al autoinjerto nervioso.

Por otro lado, los métodos de descelularización descritos en la presente Tesis Doctoral podrían ser optimizados para su uso en otras aplicaciones de la IT, como es la piel. Histológicamente, la piel contiene una MEC muy abundante, lo que la convierte en un órgano idóneo para ser sometido a protocolos de descelularización tisular. Las matrices dérmicas generadas mediante descelularización podrían ser de gran utilidad en la reparación de defectos de piel, como sustrato estructural para la generación de nuevos sustitutos de piel artificial, o incluso para su posterior solubilización e impresión 3D.

En conclusión, los resultados obtenidos con los diferentes ANDs presentaron un buen grado de regeneración funcional y tisular, aunque no superando el actual estándar de referencia, la técnica del autoinjerto. Por lo tanto, todavía son

necesarios más estudios para identificar y aportar las propiedades estructurales y biomoleculares críticas que aporta el autoinjerto nervioso y que potencian la regeneración del tejido y la inervación muscular de forma más eficaz en un periodo de tiempo reducido. En este sentido, para mejorar los resultados obtenidos e intentar alcanzar los resultados del autoinjerto, las investigaciones futuras deben de intentar potenciar los sustitutos descelularizados mediante la funcionalización de estas matrices naturales no inmunogénicas con células madre mesenquimales o biomoléculas pro-regenerativas [96,232-234].

IX CONCLUSIONES

1. VERSIÓN EN ESPAÑOL

De los resultados obtenidos en la investigación realizada en la presente Tesis Doctoral, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. El desarrollo de la presente tesis doctoral permitió elaborar, mediante nuevos métodos de descelularización tisular y crosslinking químico con genipin, nuevos aloinjertos de nervio periférico descelularizado para su uso en protocolos de ingeniería tisular.
2. La utilización de genipin, un agente químico natural, demostró ser un método eficaz para mejorar significativamente las propiedades biomecánicas de los sustitutos neurales descelularizados generados por los métodos de Sondell y Roosens. Además, el tratamiento con genipin de las matrices generadas no resultó en una alternación de la organización tisular 3D del nervio. Sin embargo, el tratamiento con genipin mostró un impacto moderado en las propiedades de adhesión y función celular *ex vivo*. La eficacia terapéutica de los sustitutos neurales descelularizados y tratados con genipin deberá ser determinada *in vivo* en estudios futuros.
3. El análisis *ex vivo* de los nuevos protocolos de descelularización neural demostraron un alto grado de eficacia en la eliminación del componente celular y contenido de mielina. El análisis biomecánico, mostró diferencias leves tras la descelularización neural, las cuales no fueron significativas. En lo que respecta a la preservación de los componentes de la matriz extracelular, el análisis histoquímico y bioquímico demostraron una adecuada preservación de la matriz colágena y una correcta eliminación de los proteoglicanos en los métodos, especialmente en con el método P2. Finalmente, el análisis biológico confirmó un alto grado de adhesión y función celular *ex vivo*, demostrando la biocompatibilidad de las matrices generadas sugiriendo la utilización *in vivo* de los sustitutos neurales generados con los protocolos 1 y 2.
4. El análisis *in vivo* de la eficacia terapéutica de los sustitutos neurales descelularizados, generados por los protocolos 1 y 2, demostraron la utilidad de los mismos en la reparación microquirúrgica de lesiones, de 10-mm de longitud, en el nervio ciático de roedores. Estos resultados muestran la integración de los sustitutos implantados, los cuales fueron estables y mantuvieron la continuidad neural durante las 15 semanas de estudio. El análisis de los aspectos clínicos y funcionales confirmaron claros signos de recuperación de las funciones motoras y sensitiva. No obstante, la valoración de la masa muscular de las extremidades operadas confirmó un proceso de recuperación parcial. A nivel histológico, no se observó ningún signo de inflamación o rechazo a nivel del tejido implantado. Las pruebas histoquímicas e inmunohistoquímicas confirmaron un activo proceso de regeneración del tejido nervioso, el cual se caracterizó por la presencia de

abundantes células de Schwann, axones neoformados y un proceso de mielinización activo. Estos resultados fueron especialmente favorables tras el uso de los sustitutos neurales descelularizados generados por el protocolo 2, los cuales fueron comparables, pero no superiores al autoinjerto nervioso. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan el uso de estos aloinjertos en la reparación de lesiones estructurales de nervios periféricos e incluso la adaptación de estos métodos de descelularización a otros tejidos u órganos como la piel. Sin embargo, aún sería necesario profundizar en el estudio de nuevas estrategias de ingeniería tisular capaces de mejorar la eficacia de los aloinjertos descelularizados, para intentar superar el autoinjerto como técnica de referencia.

2. ENGLISH VERSION

The following conclusions can be drawn from the results obtained in the research carried out in this Doctoral Thesis:

1. The development of the present Doctoral Thesis allowed the elaboration, by means of new methods of tissue decellularization and chemical crosslinking with genipin, of new decellularized peripheral nerve allografts for use in tissue engineering protocols.
2. The use of genipin, a natural chemical agent, proved to be an effective method to significantly improve the biomechanical properties of decellularized neural substitutes generated by the methods of Sondell and Roosens. Furthermore, genipin treatment of the generated matrices did not result in an alteration of the 3D tissue organization of the nerve. However, genipin treatment showed a moderate impact on cell adhesion properties and cell function *ex vivo*. The therapeutic efficacy of decellularized and genipin-treated neural substitutes should be determined *in vivo* in future studies.
3. *Ex vivo* analysis of the new neural decellularization protocols demonstrated a high degree of efficacy in the removal of cellular component and myelin content. Biomechanical analysis showed slight differences after neural decellularization, which were not significant. Regarding the preservation of the extracellular matrix components, histochemical and biochemical analysis showed adequate preservation of the collagen matrix and correct removal of proteoglycans in the methods, especially in the P2 method. Finally, biological analysis confirmed a high degree of cell adhesion and function *ex vivo*, demonstrating the biocompatibility of the generated matrices suggesting the *in vivo* use of the neural substitutes generated with protocols 1 and 2.
4. *In vivo* analysis of the therapeutic efficacy of decellularized neural substitutes generated by protocols 1 and 2 demonstrated their usefulness in the microsurgical repair of 10-mm long lesions in the sciatic nerve of rodents. These results show the integration of the implanted substitutes, which were stable and maintained neural continuity during the 15 weeks of the study. Analysis of the clinical and functional aspects confirmed clear signs of recovery of motor and sensory functions. However, the assessment of the muscle mass of the operated limbs confirmed a partial recovery process. At the histological level, no signs of inflammation or rejection were observed at the level of the implanted tissue. Histochemical and immunohistochemical tests confirmed an active regeneration process of the nerve tissue, which was characterized by the presence of abundant Schwann cells, newly formed axons and an active myelination process.

These results were especially favorable after the use of decellularized neural substitutes generated by protocol 2, which were comparable, but not superior to the nerve autograft. Therefore, the results obtained in this Doctoral Thesis support the use of these allografts in the repair of structural lesions of peripheral nerves and even the adaptation of these decellularization methods to other tissues or organs such as skin. However, it would still be necessary to further study new tissue engineering strategies capable of improving the efficacy of decellularized allografts, in order to try to overcome the autograft as the reference technique.

X BIBLIOGRAFÍA

1. Vacanti, C.A. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* **2006**, *10*, 569-576, doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
2. Campos, A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de Ingreso Real Academia Nacional de Medicina.* 2004.
3. Langer, R.; Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 920-926, doi:10.1126/science.8493529.
4. Alaminos, M.; Del Carmen Sanchez-Quevedo, M.; Muñoz-Avila, J.I.; Serrano, D.; Medialdea, S.; Carreras, I.; Campos, A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2006**, *47*, 3311-3317, doi:10.1167/iovs.05-1647.
5. Campos, A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la Descripción Microscópica a la Ingeniería Tisular*, Real Academia Nac. Medicina: 2004.
6. Kim Evans, K.F.; Mardini, S.; Salgado, C.J.; Chen, H.C. Esophagus and hypopharyngeal reconstruction. *Semin Plast Surg* **2010**, *24*, 219-226, doi:10.1055/s-0030-1255339.
7. Cuende, N. Andalusian initiative for advanced therapies: fostering synergies. *Stem Cells Transl Med* **2013**, *2*, 243-245, doi:10.5966/sctm.2013-0051.
8. Cuende, N.; Rico, L.; Herrera, C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Transl Med* **2012**, *1*, 403-408, doi:10.5966/sctm.2011-0064.
9. Cuende, N.; Izeta, A. Clinical translation of stem cell therapies: a bridgeable gap. *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 508-512, doi:10.1016/j.stem.2010.05.005.
10. Atala, A. Regenerative medicine strategies. *Journal of pediatric surgery* **2012**, *47*, 17-28, doi:10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013.
11. Campos, A. Ingeniería tisular, universidad y sistema de salud. Historia de una experiencia. *Real Academia Nacional de Medicina de España* **2019**, *136*, 142-148, doi:10.32440/ar.2019.136.02.rev07.
12. Carriel, V.; Alaminos, M.; Garzon, I.; Campos, A.; Cornelissen, M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert review of neurotherapeutics* **2014**, *14*, 301-318, doi:10.1586/14737175.2014.887444.
13. Vacanti, J. Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *J Pediatr Surg* **2010**, *45*, 291-294, doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.10.063.
14. Geneser, F. *Histología*, 2ª ed.; Médica Panamericana: Buenos Aires ; Madrid, 1993; pp. 768 p.
15. Carriel, V. Preclinical Evaluation of Bio-artificial Conduits Developed by Tissue Engineering for Peripheral Nerve Regeneration. PhD, Ghent University. Faculty of Medicine and Health Sciences; University of Granada. Faculty of Medicine, Ghent, Belgium ; Granada, Spain: , 2017.

16. Kierszenbaum, A.L. *Histology and cell biology : an introduction to pathology*, 5th edition. ed.; Elsevier Inc: St. Louis, MO, 2019; pp. pages cm.
17. Tsonis, P.A. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation* **2002**, *70*, 397-409, doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700802.x.
18. Collas, P.; Hakelien, A.M. Teaching cells new tricks. *Trends Biotechnol* **2003**, *21*, 354-361, doi:10.1016/S0167-7799(03)00147-1.
19. Bianco, P.; Robey, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* **2001**, *414*, 118-121, doi:10.1038/35102181.
20. Martin-Piedra, M.A.; Santisteban-Espejo, A.; Moral-Munoz, J.A.; Campos, F.; Chato-Astrain, J.; Garcia-Garcia, O.D.; Sanchez-Porras, D.; Campos, A. An Evolutive and Scientometric Research on Tissue Engineering Reviews. *Tissue Eng Part A* **2020**, *26*, 569-577, doi:10.1089/ten.TEA.2019.0247.
21. Durand-Herrera, D.; Campos, F.; Jaimes-Parra, B.D.; Sanchez-Lopez, J.D.; Fernandez-Valades, R.; Alaminos, M.; Campos, A.; Carriel, V. Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. *Histochem Cell Biol* **2018**, *150*, 379-393, doi:10.1007/s00418-018-1685-6.
22. Garzon, I.; Perez-Kohler, B.; Garrido-Gomez, J.; Carriel, V.; Nieto-Aguilar, R.; Martin-Piedra, M.A.; Garcia-Honduvilla, N.; Bujan, J.; Campos, A.; Alaminos, M. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue engineering. Part C, Methods* **2012**, *18*, 408-419, doi:10.1089/ten.TEC.2011.0508.
23. Garcia-Martinez, L.; Campos, F.; Godoy-Guzman, C.; Del Carmen Sanchez-Quevedo, M.; Garzon, I.; Alaminos, M.; Campos, A.; Carriel, V. Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem Cell Biol* **2017**, *147*, 83-95, doi:10.1007/s00418-016-1485-9.
24. Alaminos, M.; Perez-Kohler, B.; Garzon, I.; Garcia-Honduvilla, N.; Romero, B.; Campos, A.; Bujan, J. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **2010**, *223*, 640-647, doi:10.1002/jcp.22062.
25. Elshamy, W.M.; Duhe, R.J. Overview: cellular plasticity, cancer stem cells and metastasis. *Cancer Lett* **2013**, *341*, 2-8, doi:10.1016/j.canlet.2013.06.020.
26. Liu, T.; Chen, L.; Zhao, Z.; Zhang, S. Toward a Reconceptualization of Stem Cells from Cellular Plasticity. *Int J Stem Cells* **2019**, *12*, 1-7, doi:10.15283/ijsc18096.
27. Pastor, M.; Moreno-Sastre, M.; Esquisabel, A.; Sans, E.; Vinas, M.; Bachiller, D.; Asensio, V.J.; Pozo, A.D.; Gainza, E.; Pedraz, J.L. Sodium colistimethate loaded lipid nanocarriers for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. *Int J Pharm* **2014**, *477*, 485-494, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.10.048.

28. Chato-Astrain, J.; Chato-Astrain, I.; Sanchez-Porras, D.; Garcia-Garcia, O.D.; Bermejo-Casares, F.; Vairo, C.; Villar-Vidal, M.; Gainza, G.; Villullas, S.; Oruezabal, R.I., et al. Generation of a novel human dermal substitute functionalized with antibiotic-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) with antimicrobial properties for tissue engineering. *J Nanobiotechnology* **2020**, *18*, 174, doi:10.1186/s12951-020-00732-0.
29. Mills, S. *Histology for pathologists*; Lippincott Williams & Wilkins: 2019.
30. Campos, F.; Bonhome-Espinosa, A.B.; Vizcaino, G.; Rodriguez, I.A.; Duran-Herrera, D.; Lopez-Lopez, M.T.; Sanchez-Montesinos, I.; Alaminos, M.; Sanchez-Quevedo, M.C.; Carriel, V. Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2018**, *13*, 025021, doi:10.1088/1748-605X/aa9ad2.
31. Rozario, T.; DeSimone, D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* **2010**, *341*, 126-140, doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
32. Campos, F.; Bonhome-Espinosa, A.B.; Garcia-Martinez, L.; Duran, J.D.; Lopez-Lopez, M.T.; Alaminos, M.; Sanchez-Quevedo, M.C.; Carriel, V. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2016**, *11*, 055004, doi:10.1088/1748-6041/11/5/055004.
33. Carriel, V.; Garrido-Gomez, J.; Hernandez-Cortes, P.; Garzon, I.; Garcia-Garcia, S.; Saez-Moreno, J.A.; Del Carmen Sanchez-Quevedo, M.; Campos, A.; Alaminos, M. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of neural engineering* **2013**, *10*, 026022, doi:10.1088/1741-2560/10/2/026022.
34. Ionescu, A.M.; Alaminos, M.; de la Cruz Cardona, J.; de Dios Garcia-Lopez Duran, J.; Gonzalez-Andrades, M.; Ghinea, R.; Campos, A.; Hita, E.; del Mar Perez, M. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater* **2011**, *4*, 1963-1973, doi:10.1016/j.jmbbm.2011.06.013.
35. Scionti, G.; Moral, M.; Toledano, M.; Osorio, R.; Duran, J.D.; Alaminos, M.; Campos, A.; Lopez-Lopez, M.T. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J Biomed Mater Res A* **2014**, *102*, 2573-2582, doi:10.1002/jbm.a.34929.
36. Carriel, V.; Scionti, G.; Campos, F.; Roda, O.; Castro, B.; Cornelissen, M.; Garzon, I.; Alaminos, M. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2017**, *11*, 1412-1426, doi:10.1002/term.2039.
37. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941-2953, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
38. Williams, D.F. Regulatory biocompatibility requirements for biomaterials used in regenerative medicine. *J Mater Sci Mater Med* **2015**, *26*, 89, doi:10.1007/s10856-015-5421-7.

39. Lanza, R.P.; Langer, R.S.; Vacanti, J. *Principles of tissue engineering*, 3rd ed.; Elsevier / Academic Press: Amsterdam ; Boston, 2007; pp. xxvii, 1307 p.
40. Philips, C.; Cornelissen, M.; Carriel, V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *Journal of neural engineering* **2018**, *15*, 021003, doi:10.1088/1741-2552/aaa21a.
41. Oliveira, A.C.; Garzon, I.; Ionescu, A.M.; Carriel, V.; Cardona Jde, L.; Gonzalez-Andrades, M.; Perez Mdel, M.; Alaminos, M.; Campos, A. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One* **2013**, *8*, e66538, doi:10.1371/journal.pone.0066538.
42. Chato-Astrain, J.; Campos, F.; Roda, O.; Miralles, E.; Durand-Herrera, D.; Saez-Moreno, J.A.; Garcia-Garcia, S.; Alaminos, M.; Campos, A.; Carriel, V. In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Front Cell Neurosci* **2018**, *12*, 501, doi:10.3389/fncel.2018.00501.
43. 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. *J R Soc Interface* **2012**, *9*, 202-221, doi:10.1098/rsif.2011.0438.
44. Binyamin, G.; Shafi, B.M.; Mery, C.M. Biomaterials: a primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg* **2006**, *15*, 276-283, doi:10.1053/j.sempedsurg.2006.07.007.
45. Gonzalez-Quevedo, D.; Martinez-Medina, I.; Campos, A.; Campos, F.; Carriel, V. Tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries: a systematic review and meta-analysis of animal models. *Bone & joint research* **2018**, *7*, 318-324, doi:10.1302/2046-3758.74.BJR-2017-0326.
46. Williams, D.F. Specifications for Innovative, Enabling Biomaterials Based on the Principles of Biocompatibility Mechanisms. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2019**, *7*, 255, doi:10.3389/fbioe.2019.00255.
47. Keane, T.J.; Swinehart, I.T.; Badylak, S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods* **2015**, *84*, 25-34, doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.005.
48. Williams, D.F. The biomaterials conundrum in tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **2014**, *20*, 1129-1131, doi:10.1089/ten.tea.2013.0769.
49. Herbert, S.P.; Stainier, D.Y. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12*, 551-564, doi:10.1038/nrm3176.
50. Stocum, D.L. *Regenerative biology and medicine*; Elsevier Academic Press: Amsterdam ; Boston, 2006; pp. x, 448 p.
51. Bonhome-Espinosa, A.B.; Campos, F.; Rodriguez, I.A.; Carriel, V.; Marins, J.A.; Zubarev, A.; Duran, J.D.G.; Lopez-Lopez, M.T. Effect of particle

- concentration on the microstructural and macromechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels. *Soft Matter* **2017**, *13*, 2928-2941, doi:10.1039/c7sm00388a.
52. Gu, X.; Ding, F.; Williams, D.F. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **2014**, *35*, 6143-6156, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.064.
 53. Geuna, S.; Raimondo, S.; Ronchi, G.; Di Scipio, F.; Tos, P.; Czaja, K.; Fornaro, M. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* **2009**, *87*, 27-46, doi:10.1016/S0074-7742(09)87003-7.
 54. Yuan, A.; Rao, M.V.; Veeranna; Nixon, R.A. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* **2012**, *125*, 3257-3263, doi:10.1242/jcs.104729.
 55. Kevenaar, J.T.; Hoogenraad, C.C. The axonal cytoskeleton: from organization to function. *Front Mol Neurosci* **2015**, *8*, 44, doi:10.3389/fnmol.2015.00044.
 56. Spiegel, I.; Peles, E. Cellular junctions of myelinated nerves (Review). *Mol Membr Biol* **2002**, *19*, 95-101, doi:10.1080/09687680210130009.
 57. Arroyo, E.J.; Scherer, S.S. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* **2000**, *113*, 1-18, doi:10.1007/s004180050001.
 58. Chato-Astrain, J.; García-García, Ó.D.; Campos, F.; Sánchez-Porrás, D.; Carriel, V. Basic Nerve Histology and Histological Analyses Following Peripheral Nerve Repair and Regeneration. In *Peripheral Nerve Tissue Engineering and Regeneration*, Phillips, J., Hercher, D., Hausner, T., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2020; 10.1007/978-3-030-06217-0_14-1pp. 1-37.
 59. Griffin, J.W.; Thompson, W.J. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* **2008**, *56*, 1518-1531, doi:10.1002/glia.20778.
 60. Topp, K.S.; Boyd, B.S. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys Ther* **2006**, *86*, 92-109, doi:10.1093/ptj/86.1.92.
 61. Peltonen, S.; Alanne, M.; Peltonen, J. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers* **2013**, *1*, e24956, doi:10.4161/tisb.24956.
 62. Maretová, E. Expression of cytokeratin 18 in the peripheral nerves. *Folia Veterinaria* **2016**, *60*, 5-10.
 63. Rodriguez, F.J.; Folpe, A.L.; Giannini, C.; Perry, A. Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. *Acta Neuropathol* **2012**, *123*, 295-319, doi:10.1007/s00401-012-0954-z.
 64. Godoy-Guzman, C.; Nunez, C.; Orihuela, P.; Campos, A.; Carriel, V. Distribution of extracellular matrix molecules in human uterine tubes during the menstrual cycle: a histological and immunohistochemical analysis. *J Anat* **2018**, *233*, 73-85, doi:10.1111/joa.12814.
 65. Causey, G.; Barton, A.A. The cellular content of the endoneurium of peripheral nerve. *Brain* **1959**, *82*, 594-598, doi:10.1093/brain/82.4.594.

66. Pina-Oviedo, S.; Del Valle, L.; Baquera-Heredia, J.; Ortiz-Hidalgo, C. Immunohistochemical characterization of Renaut bodies in superficial digital nerves: further evidence supporting their perineurial cell origin. *J Peripher Nerv Syst* **2009**, *14*, 22-26, doi:10.1111/j.1529-8027.2009.00202.x.
67. Robinson, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve* **2000**, *23*, 863-873, doi:10.1002/(sici)1097-4598(200006)23:6<863::aid-mus4>3.0.co;2-0.
68. Lundborg, G. *Nerve injury and repair: regeneration, reconstruction, and cortical remodeling*; Elsevier/Churchill Livingstone: 2004.
69. Cajal, S.R. *Degeneration & regeneration of the nervous system*; Hafner Publishing Company: 1959; Vol. 1.
70. de Ruitter, G.C.; Spinner, R.J.; Verhaagen, J.; Malessy, M.J. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. *J Neurosurg* **2014**, *120*, 493-501, doi:10.3171/2013.8.JNS122300.
71. Pawlina, W.; Ross, M.H. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*; Lippincott Williams & Wilkins: 2018.
72. Navarro, X. Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int Rev Neurobiol* **2009**, *87*, 483-505, doi:10.1016/S0074-7742(09)87027-X.
73. Gordon, T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus* **2009**, *26*, E3, doi:10.3171/FOC.2009.26.2.E3.
74. Carriel, V.; Garzon, I.; Campos, A.; Cornelissen, M.; Alaminos, M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2017**, *11*, 553-563, doi:10.1002/term.1949.
75. Chen, P.; Piao, X.; Bonaldo, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol* **2015**, *130*, 605-618, doi:10.1007/s00401-015-1482-4.
76. Burnett, M.G.; Zager, E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* **2004**, *16*, E1, doi:10.3171/foc.2004.16.5.2.
77. Sunderland, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* **1951**, *74*, 491-516.
78. Dahlin, L.B. Techniques of peripheral nerve repair. *Scand J Surg* **2008**, *97*, 310-316, doi:10.1177/145749690809700407.
79. Kehoe, S.; Zhang, X.F.; Boyd, D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury* **2012**, *43*, 553-572, doi:10.1016/j.injury.2010.12.030.
80. Moore, A.M.; Wagner, I.J.; Fox, I.K. Principles of nerve repair in complex wounds of the upper extremity. *Semin Plast Surg* **2015**, *29*, 40-47, doi:10.1055/s-0035-1544169.
81. Brenner, M.J.; Hess, J.R.; Myckatyn, T.M.; Hayashi, A.; Hunter, D.A.; Mackinnon, S.E. Repair of motor nerve gaps with sensory nerve inhibits

- regeneration in rats. *Laryngoscope* **2006**, *116*, 1685-1692, doi:10.1097/01.mlg.0000229469.31749.91.
82. Pabari, A.; Yang, S.Y.; Seifalian, A.M.; Mosahebi, A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **2010**, *63*, 1941-1948, doi:10.1016/j.bjps.2009.12.010.
 83. Taras, J.S.; Amin, N.; Patel, N.; McCabe, L.A. Allograft reconstruction for digital nerve loss. *J Hand Surg Am* **2013**, *38*, 1965-1971, doi:10.1016/j.jhssa.2013.07.008.
 84. Ray, W.Z.; Mackinnon, S.E. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol* **2010**, *223*, 77-85, doi:10.1016/j.expneurol.2009.03.031.
 85. Battiston, B.; Raimondo, S.; Tos, P.; Gaidano, V.; Audisio, C.; Scevola, A.; Perroteau, I.; Geuna, S. Chapter 11: Tissue engineering of peripheral nerves. *Int Rev Neurobiol* **2009**, *87*, 227-249, doi:10.1016/S0074-7742(09)87011-6.
 86. Mackinnon, S.E.; Doolabh, V.B.; Novak, C.B.; Trulock, E.P. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg* **2001**, *107*, 1419-1429, doi:10.1097/00006534-200105000-00016.
 87. Squintani, G.; Bonetti, B.; Paolin, A.; Vici, D.; Cogliati, E.; Murer, B.; Stevanato, G. Nerve regeneration across cryopreserved allografts from cadaveric donors: a novel approach for peripheral nerve reconstruction. *J Neurosurg* **2013**, *119*, 907-913, doi:10.3171/2013.6.JNS121801.
 88. Fox, I.K.; Jaramillo, A.; Hunter, D.A.; Rickman, S.R.; Mohanakumar, T.; Mackinnon, S.E. Prolonged cold-preservation of nerve allografts. *Muscle Nerve* **2005**, *31*, 59-69, doi:10.1002/mus.20231.
 89. Ray, W.Z.; Kale, S.S.; Kasukurthi, R.; Papp, E.M.; Johnson, P.J.; Santosa, K.B.; Yan, Y.; Hunter, D.A.; Mackinnon, S.E.; Tung, T.H. Effect of cold nerve allograft preservation on antigen presentation and rejection. *J Neurosurg* **2011**, *114*, 256-262, doi:10.3171/2010.5.JNS10111.
 90. Evans, P.J.; Mackinnon, S.E.; Levi, A.D.; Wade, J.A.; Hunter, D.A.; Nakao, Y.; Midha, R. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve* **1998**, *21*, 1507-1522, doi:10.1002/(sici)1097-4598(199811)21:11<1507::aid-mus21>3.0.co;2-w.
 91. Choudhury, D.; Yee, M.; Sheng, Z.L.J.; Amirul, A.; Naing, M.W. Decellularization systems and devices: State-of-the-art. *Acta biomaterialia* **2020**, *115*, 51-59, doi:10.1016/j.actbio.2020.07.060.
 92. Buckenmeyer, M.J.; Meder, T.J.; Prest, T.A.; Brown, B.N. Decellularization techniques and their applications for the repair and regeneration of the nervous system. *Methods* **2020**, *171*, 41-61, doi:10.1016/j.ymeth.2019.07.023.
 93. Gilbert, T.W.; Sellaro, T.L.; Badylak, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3675-3683, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.

94. Keane, T.J.; Londono, R.; Turner, N.J.; Badylak, S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1771-1781, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.054.
95. Chato-Astrain, J.; Philips, C.; Campos, F.; Durand-Herrera, D.; Garcia-Garcia, O.D.; Roosens, A.; Alaminos, M.; Campos, A.; Carriel, V. Detergent-based decellularized peripheral nerve allografts: An in vivo preclinical study in the rat sciatic nerve injury model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2020**, *14*, 789-806, doi:10.1002/term.3043.
96. Lovati, A.B.; D'Arrigo, D.; Odella, S.; Tos, P.; Geuna, S.; Raimondo, S. Nerve Repair Using Decellularized Nerve Grafts in Rat Models. A Review of the Literature. *Front Cell Neurosci* **2018**, *12*, 427, doi:10.3389/fncel.2018.00427.
97. Sridharan, R.; Reilly, R.B.; Buckley, C.T. Decellularized grafts with axially aligned channels for peripheral nerve regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater* **2015**, *41*, 124-135, doi:10.1016/j.jmbbm.2014.10.002.
98. Philips, C.; Campos, F.; Roosens, A.; Sanchez-Quevedo, M.D.C.; Declercq, H.; Carriel, V. Qualitative and Quantitative Evaluation of a Novel Detergent-Based Method for Decellularization of Peripheral Nerves. *Annals of biomedical engineering* **2018**, *46*, 1921-1937, doi:10.1007/s10439-018-2082-y.
99. Osawa, T.; Tohyama, K.; Ide, C. Allogeneic nerve grafts in the rat, with special reference to the role of Schwann cell basal laminae in nerve regeneration. *J Neurocytol* **1990**, *19*, 833-849, doi:10.1007/BF01186814.
100. Cebotari, S.; Tudorache, I.; Jaekel, T.; Hilfiker, A.; Dorfman, S.; Ternes, W.; Haverich, A.; Lichtenberg, A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs* **2010**, *34*, 206-210, doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00796.x.
101. Nonaka, P.N.; Campillo, N.; Uriarte, J.J.; Garreta, E.; Melo, E.; de Oliveira, L.V.; Navajas, D.; Farre, R. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *J Biomed Mater Res A* **2014**, *102*, 413-419, doi:10.1002/jbm.a.34708.
102. Pulver; Shevtsov, A.; Leybovich, B.; Artyuhov, I.; Maleev, Y.; Peregudov, A. Production of organ extracellular matrix using a freeze-thaw cycle employing extracellular cryoprotectants. *Cryo Letters* **2014**, *35*, 400-406.
103. Szykaruk, M.; Kemp, S.W.; Wood, M.D.; Gordon, T.; Borschel, G.H. Experimental and clinical evidence for use of decellularized nerve allografts in peripheral nerve gap reconstruction. *Tissue Eng Part B Rev* **2013**, *19*, 83-96, doi:10.1089/ten.TEB.2012.0275.
104. Mardhiyah, A.; Sha'ban, M.; Azhim, A. Evaluation of histological and biomechanical properties on engineered meniscus tissues using sonication decellularization. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* **2017**, *2017*, 2064-2067, doi:10.1109/EMBC.2017.8037259.

105. Hazwani, A.; Sha'Ban, M.; Azhim, A. Characterization and in vivo study of decellularized aortic scaffolds using closed sonication system. *Organogenesis* **2019**, *15*, 120-136, doi:10.1080/15476278.2019.1656997.
106. El Soury, M.; Garcia-Garcia, O.D.; Moretti, M.; Perroteau, I.; Raimondo, S.; Lovati, A.B.; Carriel, V. Comparison of Decellularization Protocols to Generate Peripheral Nerve Grafts: A Study on Rat Sciatic Nerves. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22052389.
107. Seddon, A.M.; Curnow, P.; Booth, P.J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1666*, 105-117, doi:10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
108. Zilic, L.; Wilshaw, S.P.; Haycock, J.W. Decellularisation and histological characterisation of porcine peripheral nerves. *Biotechnol Bioeng* **2016**, *113*, 2041-2053, doi:10.1002/bit.25964.
109. Muir, D. The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair. *Exp Neurol* **2010**, *223*, 102-111, doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.038.
110. Hudson, T.W.; Liu, S.Y.; Schmidt, C.E. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng* **2004**, *10*, 1346-1358, doi:10.1089/ten.2004.10.1641.
111. O'Neill, J.D.; Anfang, R.; Anandappa, A.; Costa, J.; Javidfar, J.; Wobma, H.M.; Singh, G.; Freytes, D.O.; Bacchetta, M.D.; Sonett, J.R., et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg* **2013**, *96*, 1046-1055; discussion 1055-1046, doi:10.1016/j.athoracsur.2013.04.022.
112. Petersen, T.H.; Calle, E.A.; Colehour, M.B.; Niklason, L.E. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs* **2012**, *195*, 222-231, doi:10.1159/000324896.
113. Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3233-3243, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
114. Dong, X.; Wei, X.; Yi, W.; Gu, C.; Kang, X.; Liu, Y.; Li, Q.; Yi, D. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* **2009**, *20*, 2327-2336, doi:10.1007/s10856-009-3791-4.
115. Xu, C.C.; Chan, R.W.; Tirunagari, N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng* **2007**, *13*, 551-566, doi:10.1089/ten.2006.0169.
116. Srinivasan, M.; Sedmak, D.; Jewell, S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* **2002**, *161*, 1961-1971, doi:10.1016/S0002-9440(10)64472-0.
117. Levy, R.J.; Vyavahare, N.; Ogle, M.; Ashworth, P.; Bianco, R.; Schoen, F.J. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism. *J Heart Valve Dis* **2003**, *12*, 209-216; discussion 216.

118. Lumpkins, S.B.; Pierre, N.; McFetridge, P.S. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta biomaterialia* **2008**, *4*, 808-816, doi:10.1016/j.actbio.2008.01.016.
119. Meyer, S.R.; Chiu, B.; Churchill, T.A.; Zhu, L.; Lakey, J.R.; Ross, D.B. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A* **2006**, *79*, 254-262, doi:10.1002/jbm.a.30777.
120. Shin, Y.H.; Park, S.Y.; Kim, J.K. Comparison of systematically combined detergent and nuclease-based decellularization methods for acellular nerve graft: An ex vivo characterization and in vivo evaluation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2019**, *13*, 1241-1252, doi:10.1002/term.2874.
121. Wang, Q.; Zhang, C.; Zhang, L.; Guo, W.; Feng, G.; Zhou, S.; Zhang, Y.; Tian, T.; Li, Z.; Huang, F. The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* **2014**, *102*, 4301-4308, doi:10.1002/jbm.a.35103.
122. Gilbert, T.W.; Sellaro, T.L.; Badylak, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3675-3683.
123. Prasertsung, I.; Kanokpanont, S.; Bunaprasert, T.; Thanakit, V.; Damrongsakkul, S. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2008**, *85*, 210-219, doi:10.1002/jbm.b.30938.
124. Sheridan, W.S.; Duffy, G.P.; Murphy, B.P. Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* **2012**, *8*, 58-70, doi:10.1016/j.jmbbm.2011.12.003.
125. Stenn, K.S.; Link, R.; Moellmann, G.; Madri, J.; Kuklinska, E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol* **1989**, *93*, 287-290, doi:10.1111/1523-1747.ep12277593.
126. Walter, R.J.; Matsuda, T.; Reyes, H.M.; Walter, J.M.; Hanumadass, M. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. *Burns* **1998**, *24*, 104-113, doi:10.1016/s0305-4179(97)00110-1.
127. Lynch, A.P.; Ahearne, M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res* **2013**, *108*, 42-47, doi:10.1016/j.exer.2012.12.012.
128. Huang, M.; Li, N.; Wu, Z.; Wan, P.; Liang, X.; Zhang, W.; Wang, X.; Li, C.; Xiao, J.; Zhou, Q., et al. Using acellular porcine limbal stroma for rabbit limbal stem cell microenvironment reconstruction. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7812-7821, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.012.
129. Gluck, T. Ueber Transplantation, regeneration und entzündliche Neubildung. *Berl Klin Wochenschr* **1881**, *18*, 529-531.
130. Safa, B.; Buncke, G. Autograft Substitutes: Conduits and Processed Nerve Allografts. *Hand Clin* **2016**, *32*, 127-140, doi:10.1016/j.hcl.2015.12.012.

131. Dahlin, L.B.; Lundborg, G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* **2001**, *12*, 341-352.
132. Houshyar, S.; Bhattacharyya, A.; Shanks, R. Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures. *ACS Chem Neurosci* **2019**, *10*, 3349-3365, doi:10.1021/acscchemneuro.9b00203.
133. Chiono, V.; Tonda-Turo, C. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. *Prog Neurobiol* **2015**, *131*, 87-104, doi:10.1016/j.pneurobio.2015.06.001.
134. Wang, D.Y.; Huang, Y.Y. Fabricate coaxial stacked nerve conduits through soft lithography and molding processes. *J Biomed Mater Res A* **2008**, *85*, 434-438, doi:10.1002/jbm.a.31568.
135. Ao, Q.; Wang, A.; Cao, W.; Zhang, L.; Kong, L.; He, Q.; Gong, Y.; Zhang, X. Manufacture of multimicrotubule chitosan nerve conduits with novel molds and characterization in vitro. *J Biomed Mater Res A* **2006**, *77*, 11-18, doi:10.1002/jbm.a.30593.
136. Guo, B.; Sun, Y.; Finne-Wistrand, A.; Mustafa, K.; Albertsson, A.C. Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration. *Acta biomaterialia* **2012**, *8*, 144-153, doi:10.1016/j.actbio.2011.09.027.
137. Pozzobon, L.G.; Sperling, L.E.; Teixeira, C.E.; Malysz, T.; Pranke, P. Development of a conduit of PLGA-gelatin aligned nanofibers produced by electrospinning for peripheral nerve regeneration. *Chem Biol Interact* **2021**, *348*, 109621, doi:10.1016/j.cbi.2021.109621.
138. Agarwal, G.; Kumar, N.; Srivastava, A. Highly elastic, electroconductive, immunomodulatory graphene crosslinked collagen cryogel for spinal cord regeneration. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2021**, *118*, 111518, doi:10.1016/j.msec.2020.111518.
139. Tao, J.; Liu, H.; Wu, W.; Zhang, J.; Liu, S.; Zhang, J.; Huang, Y.; Xu, X.; He, H.; Yang, S., et al. 3D-Printed Nerve Conduits with Live Platelets for Effective Peripheral Nerve Repair. *Advanced Functional Materials* **2020**, *30*, 2004272, doi:<https://doi.org/10.1002/adfm.202004272>.
140. Spang, M.T.; Christman, K.L. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. *Acta biomaterialia* **2018**, *68*, 1-14, doi:10.1016/j.actbio.2017.12.019.
141. Li, R.; Xu, J.; Rao, Z.; Deng, R.; Xu, Y.; Qiu, S.; Long, H.; Zhu, Q.; Liu, X.; Bai, Y., et al. Facilitate Angiogenesis and Neurogenesis by Growth Factors Integrated Decellularized Matrix Hydrogel. *Tissue Eng Part A* **2021**, *27*, 771-787, doi:10.1089/ten.TEA.2020.0227.
142. Khaing, Z.Z.; Schmidt, C.E. Advances in natural biomaterials for nerve tissue repair. *Neurosci Lett* **2012**, *519*, 103-114, doi:10.1016/j.neulet.2012.02.027.
143. Chrzaszcz, P.; Derbisz, K.; Suszynski, K.; Miodonski, J.; Trybulski, R.; Lewin-Kowalik, J.; Marcol, W. Application of peripheral nerve conduits in clinical practice: A literature review. *Neurol Neurochir Pol* **2018**, *52*, 427-435, doi:10.1016/j.pjnns.2018.06.003.

144. Arslantunali, D.; Dursun, T.; Yucel, D.; Hasirci, N.; Hasirci, V. Peripheral nerve conduits: technology update. *Med Devices (Auckl)* **2014**, *7*, 405-424, doi:10.2147/MDER.S59124.
145. Meek, M.F.; Coert, J.H. US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann Plast Surg* **2008**, *60*, 110-116, doi:10.1097/SAP.0b013e31804d441c.
146. Faroni, A.; Mobasser, S.A.; Kingham, P.J.; Reid, A.J. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *82-83*, 160-167, doi:10.1016/j.addr.2014.11.010.
147. Schmidt, C.E.; Baier, J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2215-2231.
148. Arora, B.; Tandon, R.; Attri, P.; Bhatia, R. Chemical Crosslinking: Role in Protein and Peptide Science. *Curr Protein Pept Sci* **2017**, *18*, 946-955, doi:10.2174/1389203717666160724202806.
149. Courtman, D.W.; Errett, B.F.; Wilson, G.J. The role of crosslinking in modification of the immune response elicited against xenogenic vascular acellular matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2001**, *55*, 576-586.
150. Simon, P.; Kasimir, M.; Seebacher, G.; Weigel, G.; Ullrich, R.; Salzer-Muhar, U.; Rieder, E.; Wolner, E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT® in pediatric patients. *European journal of cardio-thoracic surgery* **2003**, *23*, 1002-1006.
151. Carriel, V.; Vizcaino-Lopez, G.; Chato-Astrain, J.; Durand-Herrera, D.; Alaminos, M.; Campos, A.; Sanchez-Montesinos, I.; Campos, F. Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Exp Eye Res* **2019**, *186*, 107717, doi:10.1016/j.exer.2019.107717.
152. 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 A* **2014**, *102*, 4406-4414, doi:10.1002/jbm.a.35124.
153. Fregnan, F.; Ciglieri, E.; Tos, P.; Crosio, A.; Ciardelli, G.; Ruini, F.; Tonda-Turo, C.; Geuna, S.; Raimondo, S. Chitosan crosslinked flat scaffolds for peripheral nerve regeneration. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2016**, *11*, 045010, doi:10.1088/1748-6041/11/4/045010.
154. Yang, C.R.; Chen, J.D. Preparation and biological evaluation of chitosan-collagen-icariin composite scaffolds for neuronal regeneration. *Neurol Sci* **2013**, *34*, 941-947, doi:10.1007/s10072-012-1165-z.
155. Sung, H.W.; Huang, R.N.; Huang, L.L.; Tsai, C.C.; Chiu, C.T. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *J Biomed Mater Res* **1998**, *42*, 560-567, doi:10.1002/(sici)1097-4636(19981215)42:4<560::aid-jbm12>3.0.co;2-i.

156. Musilkova, J.; Filova, E.; Pala, J.; Matejka, R.; Hadraba, D.; Vondrasek, D.; Kaplan, O.; Riedel, T.; Brynda, E.; Kucerova, J., et al. Human decellularized and crosslinked pericardium coated with bioactive molecular assemblies. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2019**, 10.1088/1748-605X/ab52db, doi:10.1088/1748-605X/ab52db.
157. Tang, Y.; Song, W.; Qiao, J.; Rong, B.; Wu, Y.; Yan, X. A study of corneal structure and biomechanical properties after collagen crosslinking with genipin in rabbit corneas. *Mol Vis* **2019**, 25, 574-582.
158. Jiang, T.; Ren, X.-J.; Tang, J.-L.; Yin, H.; Wang, K.-J.; Zhou, C.-L. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, 33, 3514-3521.
159. Gu, Y.; Wang, F.; Wang, R.; Li, J.; Wang, C.; Li, L.; Xu, Z.; Zhang, J. Preparation and evaluation of decellularized porcine carotid arteries cross-linked by genipin: the preliminary results. *Cell Tissue Bank* **2018**, 19, 311-321, doi:10.1007/s10561-017-9675-9.
160. Gorczyca, G.; Tylingo, R.; Szweda, P.; Augustin, E.; Sadowska, M.; Milewski, S. Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydr Polym* **2014**, 102, 901-911, doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.060.
161. Vyborny, K.; Vallova, J.; Koci, Z.; Kekulova, K.; Jirakova, K.; Jendelova, P.; Hodan, J.; Kubinova, S. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. *Scientific reports* **2019**, 9, 10674, doi:10.1038/s41598-019-47059-x.
162. Jiang, T.; Ren, X.J.; Tang, J.L.; Yin, H.; Wang, K.J.; Zhou, C.L. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2013**, 33, 3514-3521, doi:10.1016/j.msec.2013.04.046.
163. Gonzalez-Quevedo, D.; Diaz-Ramos, M.; Chato-Astrain, J.; Sanchez-Porras, D.; Tamimi, I.; Campos, A.; Campos, F.; Carriel, V. Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose-based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model. *Bone Joint J* **2020**, 102-B, 1095-1106, doi:10.1302/0301-620X.102B8.BJJ-2019-1143.R2.
164. Koo, H.J.; Song, Y.S.; Kim, H.J.; Lee, Y.H.; Hong, S.M.; Kim, S.J.; Kim, B.C.; Jin, C.; Lim, C.J.; Park, E.H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol* **2004**, 495, 201-208, doi:10.1016/j.ejphar.2004.05.031.
165. Zhong, Y.; Jiang, A.; Sun, F.; Xiao, Y.; Gu, Y.; Wu, L.; Zhang, Y.; Shi, H. A Comparative Study of the Effects of Different Decellularization Methods and Genipin-Cross-Linking on the Properties of Tracheal Matrices. *Tissue Eng Regen Med* **2019**, 16, 39-50, doi:10.1007/s13770-018-0170-6.
166. Koci, Z.; Sridharan, R.; Hibbitts, A.J.; Kneafsey, S.L.; Kearney, C.J.; O'Brien, F.J. The Use of Genipin as an Effective, Biocompatible, Anti-Inflammatory Cross-Linking Method for Nerve Guidance Conduits. *Adv Biosyst* **2020**, 4, e1900212, doi:10.1002/adbi.201900212.

167. Zhang, L.; Zhao, W.; Niu, C.; Zhou, Y.; Shi, H.; Wang, Y.; Yang, Y.; Tang, X. Genipin-Cross-Linked Chitosan Nerve Conduits Containing TNF-alpha Inhibitors for Peripheral Nerve Repair. *Annals of biomedical engineering* **2018**, *46*, 1013-1025, doi:10.1007/s10439-018-2011-0.
168. Lau, Y.T.; Kwok, L.F.; Tam, K.W.; Chan, Y.S.; Shum, D.K.; Shea, G.K. Genipin-treated chitosan nanofibers as a novel scaffold for nerve guidance channel design. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2018**, *162*, 126-134, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.11.061.
169. Chang, C.J. Effects of nerve growth factor from genipin-crosslinked gelatin in polycaprolactone conduit on peripheral nerve regeneration--in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* **2009**, *91*, 586-596, doi:10.1002/jbm.a.32252.
170. Garcia-Garcia, O.D.; El Soury, M.; Gonzalez-Quevedo, D.; Sanchez-Porras, D.; Chato-Astrain, J.; Campos, F.; Carriel, V. Histological, Biomechanical, and Biological Properties of Genipin-Crosslinked Decellularized Peripheral Nerves. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22020674.
171. Tohill, M.; Terenghi, G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem* **2004**, *40*, 17-24, doi:10.1042/BA20030173.
172. Fairless, R.; Barnett, S.C. Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, *37*, 693-699, doi:10.1016/j.biocel.2004.10.010.
173. Ding, F.; Wu, J.; Yang, Y.; Hu, W.; Zhu, Q.; Tang, X.; Liu, J.; Gu, X. 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* **2010**, *16*, 3779-3790, doi:10.1089/ten.TEA.2010.0299.
174. Oliveira, J.T.; Almeida, F.M.; Biancalana, A.; Baptista, A.F.; Tomaz, M.A.; Melo, P.A.; Martinez, A.M. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. *Neuroscience* **2010**, *170*, 1295-1303, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.042.
175. di Summa, P.G.; Kingham, P.J.; Raffoul, W.; Wiberg, M.; Terenghi, G.; Kalbermatten, D.F. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **2010**, *63*, 1544-1552, doi:10.1016/j.bjps.2009.09.012.
176. Kingham, P.J.; Kalbermatten, D.F.; Mahay, D.; Armstrong, S.J.; Wiberg, M.; Terenghi, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **2007**, *207*, 267-274, doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.029.
177. Radtke, C.; Schmitz, B.; Spies, M.; Kocsis, J.D.; Vogt, P.M. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci* **2009**, *27*, 817-823, doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.006.

178. Chen, Y.S.; Chang, J.Y.; Cheng, C.Y.; Tsai, F.J.; Yao, C.H.; Liu, B.S. An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3911-3918, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.060.
179. Kaewkhaw, R.; Scutt, A.M.; Haycock, J.W. Anatomical site influences the differentiation of adipose-derived stem cells for Schwann-cell phenotype and function. *Glia* **2011**, *59*, 734-749, doi:10.1002/glia.21145.
180. Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K.; Barua, N.U.; Patel, N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* **2013**, *138*, 155-175, doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.004.
181. Nectow, A.R.; Marra, K.G.; Kaplan, D.L. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng Part B Rev* **2012**, *18*, 40-50, doi:10.1089/ten.TEB.2011.0240.
182. Madduri, S.; Gander, B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* **2010**, *15*, 93-103, doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00257.x.
183. Deister, C.; Schmidt, C.E. Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *Journal of neural engineering* **2006**, *3*, 172-179, doi:10.1088/1741-2560/3/2/011.
184. Peleshok, J.; Saragovi, H.U. Functional mimetics of neurotrophins and their receptors. *Biochem Soc Trans* **2006**, *34*, 612-617, doi:10.1042/BST0340612.
185. Wood, M.D.; MacEwan, M.R.; French, A.R.; Moore, A.M.; Hunter, D.A.; Mackinnon, S.E.; Moran, D.W.; Borschel, G.H.; Sakiyama-Elbert, S.E. Fibrin matrices with affinity-based delivery systems and neurotrophic factors promote functional nerve regeneration. *Biotechnol Bioeng* **2010**, *106*, 970-979, doi:10.1002/bit.22766.
186. Shen, H.; Shen, Z.L.; Zhang, P.H.; Chen, N.L.; Wang, Y.C.; Zhang, Z.F.; Jin, Y.Q. Ciliary neurotrophic factor-coated polylactic-polyglycolic acid chitosan nerve conduit promotes peripheral nerve regeneration in canine tibial nerve defect repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2010**, *95*, 161-170, doi:10.1002/jbm.b.31696.
187. Liu, J.J.; Wang, C.Y.; Wang, J.G.; Ruan, H.J.; Fan, C.Y. Peripheral nerve regeneration using composite poly(lactic acid-caprolactone)/nerve growth factor conduits prepared by coaxial electrospinning. *J Biomed Mater Res A* **2011**, *96*, 13-20, doi:10.1002/jbm.a.32946.
188. Hobson, M.I. Increased vascularisation enhances axonal regeneration within an acellular nerve conduit. *Ann R Coll Surg Engl* **2002**, *84*, 47-53.
189. Zhang, X.F.; Liu, H.X.; Ortiz, L.S.; Xiao, Z.D.; Huang, N.P. Laminin-modified and aligned poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/polyethylene oxide nanofibrous nerve conduits promote peripheral nerve regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2018**, *12*, e627-e636, doi:10.1002/term.2355.
190. Chang, W.; Shah, M.B.; Zhou, G.; Walsh, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S.G.; Yu, X. Polymeric nanofibrous nerve conduits coupled with laminin for

- peripheral nerve regeneration. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2020**, *15*, 035003, doi:10.1088/1748-605X/ab6994.
191. Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385-4415, doi:10.1016/s0142-9612(03)00343-0.
 192. Zhu, L.; Wang, K.; Ma, T.; Huang, L.; Xia, B.; Zhu, S.; Yang, Y.; Liu, Z.; Quan, X.; Luo, K., et al. Noncovalent Bonding of RGD and YIGSR to an Electrospun Poly(epsilon-Caprolactone) Conduit through Peptide Self-Assembly to Synergistically Promote Sciatic Nerve Regeneration in Rats. *Adv Healthc Mater* **2017**, *6*, doi:10.1002/adhm.201600860.
 193. Yan, Q.; Yin, Y.; Li, B. Use new PLGL-RGD-NGF nerve conduits for promoting peripheral nerve regeneration. *Biomed Eng Online* **2012**, *11*, 36, doi:10.1186/1475-925X-11-36.
 194. Cavanaugh, M.; Silantyeva, E.; Pylypiv Koh, G.; Malekzadeh, E.; Lanzinger, W.D.; Willits, R.K.; Becker, M.L. RGD-Modified Nanofibers Enhance Outcomes in Rats after Sciatic Nerve Injury. *J Funct Biomater* **2019**, *10*, doi:10.3390/jfb10020024.
 195. Sondell, M.; Lundborg, G.; Kanje, M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* **1998**, *795*, 44-54, doi:10.1016/s0006-8993(98)00251-0.
 196. Roosens, A.; Somers, P.; De Somer, F.; Carriel, V.; Van Nooten, G.; Cornelissen, R. Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering. *Annals of biomedical engineering* **2016**, *44*, 2827-2839, doi:10.1007/s10439-016-1555-0.
 197. Carriel, V.; Campos, A.; Alaminos, M.; Raimondo, S.; Geuna, S. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods Mol Biol* **2017**, *1560*, 207-218, doi:10.1007/978-1-4939-6788-9_15.
 198. Carriel, V.; Garzon, I.; Alaminos, M.; Campos, A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochem Cell Biol* **2011**, *136*, 709-717, doi:10.1007/s00418-011-0874-3.
 199. Rodriguez-Arco, L.; Rodriguez, I.A.; Carriel, V.; Bonhome-Espinosa, A.B.; Campos, F.; Kuzhir, P.; Duran, J.D.; Lopez-Lopez, M.T. Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues. *Nanoscale* **2016**, *8*, 8138-8150, doi:10.1039/c6nr00224b.
 200. Ronchi, G.; Jager, S.B.; Vaegter, C.B.; Raimondo, S.; Giacobini-Robecchi, M.G.; Geuna, S. Discrepancies in quantitative assessment of normal and regenerated peripheral nerve fibers between light and electron microscopy. *J Peripher Nerv Syst* **2014**, *19*, 224-233, doi:10.1111/jns.12090.
 201. Carriel, V.S.; Aneiros-Fernandez, J.; Arias-Santiago, S.; Garzon, I.J.; Alaminos, M.; Campos, A. A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *The journal of*

- histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **2011**, 59, 270-277, doi:10.1369/0022155410398001.
202. Vleggeert-Lankamp, C.L. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation. *J Neurosurg* **2007**, 107, 1168-1189, doi:10.3171/JNS-07/12/1168.
 203. Carriel, V.; Garzon, I.; Alaminos, M.; Cornelissen, M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural regeneration research* **2014**, 9, 1657-1660, doi:10.4103/1673-5374.141798.
 204. Monte-Raso, V.V.; Barbieri, C.H.; Mazzer, N.; Yamasita, A.C.; Barbieri, G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods* **2008**, 170, 255-261, doi:10.1016/j.jneumeth.2008.01.022.
 205. Campos, F.; Bonhome-Espinosa, A.B.; Chato-Astrain, J.; Sanchez-Porras, D.; Garcia-Garcia, O.D.; Carmona, R.; Lopez-Lopez, M.T.; Alaminos, M.; Carriel, V.; Rodriguez, I.A. Evaluation of Fibrin-Agarose Tissue-Like Hydrogels Biocompatibility for Tissue Engineering Applications. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, 8, 596, doi:10.3389/fbioe.2020.00596.
 206. Campos, F.; Bonhome-Espinosa, A.B.; Carmona, R.; Duran, J.D.G.; Kuzhir, P.; Alaminos, M.; Lopez-Lopez, M.T.; Rodriguez, I.A.; Carriel, V. In vivo time-course biocompatibility assessment of biomagnetic nanoparticles-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2021**, 118, 111476, doi:10.1016/j.msec.2020.111476.
 207. Kampfmann, I.; Bauer, N.; Johannes, S.; Moritz, A. Differences in hematologic variables in rats of the same strain but different origin. *Vet Clin Pathol* **2012**, 41, 228-234, doi:10.1111/j.1939-165X.2012.00427.x.
 208. Shea, J.E.; Garlick, J.W.; Salama, M.E.; Mendenhall, S.D.; Moran, L.A.; Agarwal, J.P. Side-to-side nerve bridges reduce muscle atrophy after peripheral nerve injury in a rodent model. *J Surg Res* **2014**, 187, 350-358, doi:10.1016/j.jss.2013.10.023.
 209. Geuna, S.; Tos, P.; Battiston, B.; Guglielmone, R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Ann Anat* **2000**, 182, 23-34, doi:10.1016/S0940-9602(00)80117-X.
 210. Kingham, P.J.; Terenghi, G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat* **2006**, 209, 511-526, doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00623.x.
 211. Moore, A.M.; Kasukurthi, R.; Magill, C.K.; Farhadi, H.F.; Borschel, G.H.; Mackinnon, S.E. Limitations of conduits in peripheral nerve repairs. *Hand (N Y)* **2009**, 4, 180-186, doi:10.1007/s11552-008-9158-3.
 212. Yu, T.; Wen, L.; He, J.; Xu, Y.; Li, T.; Wang, W.; Ma, Y.; Ahmad, M.A.; Tian, X.; Fan, J., et al. Fabrication and evaluation of an optimized acellular

- nerve allograft with multiple axial channels. *Acta biomaterialia* **2020**, *115*, 235-249, doi:10.1016/j.actbio.2020.07.059.
213. Chernousov, M.A.; Yu, W.M.; Chen, Z.L.; Carey, D.J.; Strickland, S. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia* **2008**, *56*, 1498-1507, doi:10.1002/glia.20740.
 214. Xiao, W.; Li, S.; Wang, S.; Ho, C.T. Chemistry and bioactivity of Gardenia jasminoides. *J Food Drug Anal* **2017**, *25*, 43-61, doi:10.1016/j.jfda.2016.11.005.
 215. Nair, M.; Johal, R.K.; Hamaia, S.W.; Best, S.M.; Cameron, R.E. Tunable bioactivity and mechanics of collagen-based tissue engineering constructs: A comparison of EDC-NHS, genipin and TG2 crosslinkers. *Biomaterials* **2020**, *254*, 120109, doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120109.
 216. Tambe, N.; Di, J.; Zhang, Z.; Bernacki, S.; El-Shafei, A.; King, M.W. Novel genipin-collagen immobilization of polylactic acid (PLA) fibers for use as tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2015**, *103*, 1188-1197, doi:10.1002/jbm.b.33285.
 217. Zor, F.; Selek, F.N.; Orlando, G.; Williams, D.F. Biocompatibility in regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* **2019**, *14*, 2763-2775, doi:10.2217/nnm-2019-0140.
 218. Zhang, X.; Chen, X.; Yang, T.; Zhang, N.; Dong, L.; Ma, S.; Liu, X.; Zhou, M.; Li, B. The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell Tissue Bank* **2014**, *15*, 531-541, doi:10.1007/s10561-014-9423-3.
 219. Gobinathan, S.; Zainol, S.S.; Azizi, S.F.; Iman, N.M.; Muniandy, R.; Hasmad, H.N.; Yusof, M.R.B.; Husain, S.; Abd Aziz, H.; Lokanathan, Y. Decellularization and genipin crosslinking of amniotic membrane suitable for tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed* **2018**, *29*, 2051-2067, doi:10.1080/09205063.2018.1485814.
 220. Elder, S.; Pinheiro, A.; Young, C.; Smith, P.; Wright, E. Evaluation of genipin for stabilization of decellularized porcine cartilage. *J Orthop Res* **2017**, *35*, 1949-1957, doi:10.1002/jor.23483.
 221. Hernandez-Cortes, P.; Garrido, J.; Camara, M.; Ravassa, F.O. Failed digital nerve reconstruction by foreign body reaction to Neurolac nerve conduit. *Microsurgery* **2010**, *30*, 414-416, doi:10.1002/micr.20730.
 222. Liodaki, E.; Bos, I.; Lohmeyer, J.A.; Senyaman, O.; Mauss, K.L.; Siemers, F.; Mailaender, P.; Stang, F. Removal of collagen nerve conduits (NeuraGen) after unsuccessful implantation: focus on histological findings. *J Reconstr Microsurg* **2013**, *29*, 517-522, doi:10.1055/s-0033-1348033.
 223. Lodish, H. *Biología celular y molecular*, Ed. Médica Panamericana: 2005.
 224. Geuna, S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods* **2015**, *243*, 39-46, doi:10.1016/j.jneumeth.2015.01.021.
 225. Wall, P.D.; Devor, M.; Inbal, R.; Scadding, J.W.; Schonfeld, D.; Seltzer, Z.; Tomkiewicz, M.M. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* **1979**, *7*, 103-113, doi:10.1016/0304-3959(79)90002-2.

226. Stang, F.; Stollwerck, P.; Prommersberger, K.J.; van Schoonhoven, J. Posterior interosseus nerve vs. medial cutaneous nerve of the forearm: differences in digital nerve reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg* **2013**, *133*, 875-880, doi:10.1007/s00402-013-1731-8.
227. Liu, G.; Cheng, Y.; Guo, S.; Feng, Y.; Li, Q.; Jia, H.; Wang, Y.; Tong, L.; Tong, X. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int J Mol Med* **2011**, *28*, 565-572, doi:10.3892/ijmm.2011.725.
228. Rosalki, S.B. Low serum creatine kinase activity. *Clin Chem* **1998**, *44*, 905.
229. Zhao, Z.; Wang, Y.; Peng, J.; Ren, Z.; Zhang, L.; Guo, Q.; Xu, W.; Lu, S. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplant* **2014**, *23*, 97-110, doi:10.3727/096368912X658845.
230. Raimondo, S.; Fornaro, M.; Di Scipio, F.; Ronchi, G.; Giacobini-Robecchi, M.G.; Geuna, S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II-morphological techniques. *Int Rev Neurobiol* **2009**, *87*, 81-103, doi:10.1016/S0074-7742(09)87005-0.
231. Ronchi, G.; Raimondo, S.; Geuna, S.; Gambarotta, G. New insights on the standardization of peripheral nerve regeneration quantitative analysis. *Neural regeneration research* **2015**, *10*, 707-709, doi:10.4103/1673-5374.156962.
232. Garcia-Perez, M.M.; Martinez-Rodriguez, H.G.; Lopez-Guerra, G.G.; Soto-Dominguez, A.; Said-Fernandez, S.L.; Morales-Avalos, R.; Elizondo-Omana, R.E.; Montes-de-Oca-Luna, R.; Guzman-Lopez, S.; Castillo-Galvan, M.L., et al. A modified chemical protocol of decellularization of rat sciatic nerve and its recellularization with mesenchymal differentiated schwann-like cells: morphological and functional assessments. *Histol Histopathol* **2017**, *32*, 779-792, doi:10.14670/HH-11-844.
233. Hoben, G.; Yan, Y.; Iyer, N.; Newton, P.; Hunter, D.A.; Moore, A.M.; Sakiyama-Elbert, S.E.; Wood, M.D.; Mackinnon, S.E. Comparison of acellular nerve allograft modification with Schwann cells or VEGF. *Hand (N Y)* **2015**, *10*, 396-402, doi:10.1007/s11552-014-9720-0.
234. Jia, H.; Wang, Y.; Tong, X.J.; Liu, G.B.; Li, Q.; Zhang, L.X.; Sun, X.H. Sciatic nerve repair by acellular nerve xenografts implanted with BMSCs in rats xenograft combined with BMSCs. *Synapse* **2012**, *66*, 256-269, doi:10.1002/syn.21508.