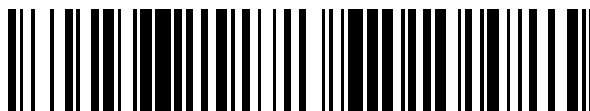


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 789**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2010 E 10160062 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2380601**

54 Título: **Conducto para nervios multicanal de colágeno para la reparación de nervios**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2013

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND (100.0%)
Galway University Road
Galway, IE**

72 Inventor/es:

**PANDIT, ABHAY;
YAO, LI y
WINDEBANK, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 405 789 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conducto para nervios multicanal de colágeno para la reparación de nervios

La presente invención se refiere a la fabricación de conductos para nervios multicanales para su uso en la reparación de lesiones de nervios. En particular, la invención se refiere a conductos para nervios multicanales de colágeno que son adecuados para su uso en la reparación de los nervios periféricos.

Antecedentes de la invención

Las lesiones de los nervios periféricos pueden producirse por traumatismos y por lesión iatrogénica. Cada año, en los EE.UU. y en Europa se producen más de 700.000 lesiones de nervios periféricos como consecuencia de traumatismos accidentales y durante las cirugías. En la mayoría de las lesiones los extremos de los nervios no pueden ponerse uno frente al otro. Actualmente existen dos opciones para la reparación en esta situación. A pesar de que un injerto autólogo de nervio es el estándar de referencia en la reparación de nervios por medio de injerto, tiene varias desventajas, incluyendo la necesidad de realizar una nueva incisión, la pérdida de la función del nervio donante, la falta de coincidencia de tamaños entre el nervio donante y el nervio lesionado y una limitada disponibilidad de nervios donantes. La segunda alternativa prometedora es utilizar un "tubo para nervios" sintético como un conducto para la regeneración. Una diversidad de biopolímeros sintéticos y naturales, tales como el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, el quitosano, el alginato de seda y sus compuestos o derivados, han mostrado niveles variables de éxito y defectos [Jiao y col., 2009; Yang y col., 2007; Matsmoto y col., 2000; Evans y col., 2002; Toba y col., 2002; Thomas y col., 2005; Wang y col., 2005; Bellamkonda, 2006; Jiang y col., 2007].

La matriz de tejido nervioso está compuesta de tubos de lámina basal que rodean a la unidad axón-célula de Schwann y fibrillas de colágeno orientadas longitudinalmente. Existen amplias y convincentes pruebas de que el éxito de la regeneración nerviosa periférica depende de la matriz extracelular [Giannini y col., 1990; Sorenson y col., 1993]. El colágeno, el principal componente estructural de estas estructuras, es una molécula de matriz extracelular (ECM) que puede tener ventajas específicas sobre otros polímeros sintéticos y naturales, ya que posee dominios de adhesión y de señalización celular que son fundamentales para la regeneración del nervio. Como el colágeno puede presentar un microentorno biológico altamente relevante para el crecimiento axonal, se han desarrollado una variedad de conductos de colágeno para estudios de regeneración de nervios [Archibald y col., 1991; Collin y col., 1984; Laquerriere y col., 1993].

Los estudios previos sobre regeneración de nervios se han realizado predominantemente en base a conductos de un solo canal [Jiao y col., 2009; Yang y col., 2007; Matsmoto y col., 2000; Evans y col., 2002; Toba y col., 2002; Thomas y col., 2005; Wang y col., 2005; Bellamkonda y col., 2006; Jiang y col., 2007]. Se han investigado estructuras fibrosas y microranuras y se han introducido en el diseño de los conductos para nervios para mejorar la orientación del crecimiento axonal [Chew y col., 2007; Yang y col., 2008; Kim y col., 2007; Yao y col., 2009 1, 2]. Sin embargo, independientemente de la microtopografía de la superficie, la reparación con tubos para nervios de un solo canal puede dar lugar a una reinervación inadecuada de la diana debida a la dispersión de los axones de regeneración a través del injerto. [Brushart y col., 1995; de Ruitter y col., 2008b]. Aunque un estudio previo sobre reparación de nervios basado en conductos multicanal de PLGA indicó una menor dispersión axonal en comparación con el conducto de un solo canal, la mayoría de los conductos de PLGA se hincharon y se colapsaron en el plazo experimental (de Ruitter G y col., 2008b).

Los conductos multicanal de colágeno que se asemejan a la estructura de los tubos múltiples de la lámina basal de los nervios pueden limitar la dispersión de la regeneración de los axones y proporcionar orientación para el crecimiento del nervio. Al fabricar la próxima generación de conductos para nervios, es necesario tener presentes varios aspectos. Estos incluyen la biocompatibilidad de los materiales, y las propiedades mecánicas y de degradación personalizadas. Los conductos de colágeno de un solo canal que poseen resistencia mecánica y son fáciles de procesar han sido utilizados previamente en aplicaciones para la regeneración de nervios. Debido a que los canales de los conductos multicanal de colágeno son mucho más pequeños que los conductos de un solo canal, una leve hinchazón y deformación puede reducir significativamente las cavidades de los canales e impedir el crecimiento de los nervios. La fabricación de conductos multicanal de colágeno es muy exigente y necesita una buena programación y optimización.

Una serie de conductos para nervios están autorizados por la FDA para defectos nerviosos relativamente cortos, como el tubo de colágeno Tipo I de Integra Neurosciences, NeuraGen™, neuroflex de Collagen Matrix Inc. y Neurptube™ de Synovis Surgical Innovations. Estos son tubos de un solo canal que se usan únicamente para pequeños defectos de varios milímetros y no abordan lesiones más grandes de nervios periféricos. Además, los axones que se regeneran a través de estos tubos de un solo lumen asumen una dirección dispersa, lo que da como resultado una reinervación inapropiada de la diana y la contracción simultánea de los músculos opuestos o sincinesia. La ventaja de los conductos para nervios multicanal es que la dispersión puede ser limitada ya que se asemejan a la estructura de tubos múltiples de la lámina basal de los nervios.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un conducto para nervios robusto a base de colágeno con múltiples canales de diámetro inferior al milímetro y dimensionalmente estables para facilitar la orientación del nervio y limitar

la dispersión. Con este objetivo, los autores han desarrollado una innovadora técnica de moldeo de múltiples etapas (secuencial) para crear conductos de 1, 4 y 7 canales a partir de una disolución con alta concentración de colágeno. Los conductos se reticularon con (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en N-hidroxisuccinimida (NHS)) para controlar la velocidad de biodegradación y para limitar la hinchazón.

5 Para examinar la biocompatibilidad del colágeno reticulado, se cultivaron ganglios de la raíz dorsal en los sustratos y se cuantificó el crecimiento axonal. Puesto que la robustez mecánica y la capacidad de retroceso elástico de los conductos son esenciales para la implantación y el éxito posquirúrgico, las propiedades mecánicas estructurales se caracterizaron por medio de pruebas de tracción, compresión y flexión de tres puntos. Esta combinación de análisis químicos, biológicos y mecánicos es necesaria para determinar el diseño óptimo del biomaterial para los estudios de implantación.

10 Los conductos se implantaron en un defecto de 1 cm del nervio ciático de la rata y la regeneración nerviosa se evaluó mediante el uso de registros del potencial de acción muscular compuesto (CMAP), morfometría cuantitativa del nervio y estudios de marcaje axonal retrógrado simultáneo.

15 De Ruitter, y col. (Journal of Biomedical Materials Research, 2008, pág. 643-651) describen un conducto para nervios de múltiples canales fabricado de un polímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) sintético que se fabrica por medio de una técnica de moldeo por inyección y evaporación de disolvente. La patente de EE.UU. Nº 5019087 da a conocer un procedimiento de hilado de una mezcla de colágeno y laminina sobre un mandril para producir un conducto para nervios de un solo canal.

Objeto de la invención

20 Es un objeto de la presente invención proporcionar un conducto para nervios adecuado para la reparación de nervios periféricos. Otro objeto de la invención es proporcionar un andamiaje de biomaterial con propiedades materiales y mecánicas favorables. Otro objeto es proporcionar un conducto para nervios multicanal de colágeno con mínimas propiedades de hinchazón y deformación. Otro objeto es proporcionar conductos para nervios que puedan adaptarse para incorporar biomoléculas terapéuticas. Otros objetos más son proporcionar conductos con baja toxicidad para el tejido circundante, y que sean biocompatibles y biodegradables, y que además promuevan el crecimiento de los nervios de una manera regular y controlada. Otro objeto es proporcionar un conducto para nervios con una resistencia mecánica alta.

Resumen de la invención

30 Según la presente invención, se proporciona un procedimiento de fabricación de un conducto para nervios multicanal de colágeno que comprende:

(a) colocar al menos una matriz alargada entre dos retenedores de un molde de conducto para nervios multicanal de tal manera que las matrices se mantengan separadas entre sí,

(b) verter la disolución de colágeno sobre cada matriz de manera que se recubra sustancialmente toda la matriz,

(c) secar la disolución de colágeno en las matrices,

35 (d) repetir las etapas (a) a (c) con más matrices hasta que se hayan usado tantas matrices como el número de canales deseados en el conducto,

(e) reticular el colágeno seco en las matrices, y

(f) lavar el colágeno reticulado sobre las matrices para retirar la disolución de reticulación residual. La invención también proporciona un procedimiento de fabricación de un conducto para nervios multicanal de colágeno que comprende:

40

(a) colocar al menos una matriz alargada entre los dos extremos terminales o retenedores,

(b) verter la disolución de colágeno sobre la matriz de manera que se recubra sustancialmente toda la matriz,

(c) dejar secar la disolución de colágeno en la matriz,

45 (d) reticular el colágeno secado al aire en la matriz,

(e) lavar el colágeno reticulado en la matriz para eliminar el agente de reticulación.

Se sitúa un retenedor en cada extremo de la matriz alargada. Las matrices y los retenedores actúan de este modo como un molde negativo.

50 Se puede verter más disolución de colágeno alrededor de la construcción de colágeno seco en la matriz y/o se vierte alrededor del retenedor.

La concentración de colágeno puede ser de entre 3 y 15 mg/ml, de preferencia de 12 mg/ml. Esta disolución de alta concentración de colágeno (12 mg/ml) puede producir conductos de colágeno de manera muy eficiente.

El colágeno se puede secar al aire.

5 El agente de reticulación se puede seleccionar del grupo que consiste en EDC, transglutaminasa, glutaraldehído, genepin, sulfonatos, incluidos el sulfonato de metilo y sulfonato de trifluorometilo, maleimida, sistemas dendrímicos de polietilenglicol tales como 4S-StarPEG, polímeros dendríticos, polímeros dendríticos hiper-ramificados, formaldehído, agente de reticulación enzimático, glicación, gliceraldehídos, cianamida, diimida, diisocianato, adipimidato de dimetilo, carbodiimida y epoxi. El colágeno seco se puede reticular con una disolución de EDC 1 a 60 mM y NHS 1-30 mM en disolución de MES 1-100 mM, de preferencia EDC 30 mM y NHS 10 mM en disolución de 10 MES 50 mM.

15 Cuando se utilizan EDC y NHS, la concentración utilizada para la reticulación puede afectar a la biocompatibilidad del conducto. Los resultados del cultivo de células de ganglios de la raíz dorsal (DRG) mostraron que una concentración de EDC de hasta 60 mM no afecta de manera significativa el crecimiento axonal. Además, la concentración de EDC/NHS puede afectar a la velocidad de degradación del conducto. Las propiedades de degradación del conducto de colágeno se pueden ajustar mediante el cambio de la concentración de EDC en el intervalo de hasta 60 mM.

En un estudio *in vivo*, los inventores utilizaron EDC 30 mM/NHS 10 mM para reticular el conducto de colágeno. En este nivel de reticulación, la velocidad de degradación del conducto es más baja y no se presenta ningún efecto negativo significativo sobre la biocompatibilidad del conducto.

20 La etapa de lavado puede llevarse a cabo con NaH_2PO_4 0,1-0,2 M y agua destilada. Los conductos se deben lavar por lo menos 4 veces durante un total de 2 horas. Después del lavado, el colágeno se puede liofilizar en la matriz. El conducto para nervios de colágeno se puede retirado de la matriz. La matriz puede ser un alambre o un pincho, y puede ser de metal o de plástico. La matriz puede ser de acero inoxidable o nitinol.

25 En el procedimiento de liofilización, primero se congelaron las muestras húmedas (los conductos de colágeno fabricados en las matrices) en la cámara de una máquina de liofilización, a continuación, se evacuó el aire de la cámara para eliminar el agua. Una vez que las muestras fueron liofilizadas, las matrices se retiran fácilmente de los conductos de colágeno.

30 El conducto para nervios puede tener un número de canales, tal como 2 a 200 o más, de preferencia dos o cuatro o siete canales, pero particularmente de preferencia tiene cuatro canales. De preferencia, los canales son de tamaño uniforme y están separados de manera uniforme. Esto se consigue separando uniformemente las matrices y mediante el uso de matrices del mismo tamaño. Los conductos de cuatro canales ofrecen buenos resultados de regeneración nerviosa y también buenos resultados de limitación de la dispersión axonal. La fabricación de un conducto de 7 canales es más complicada en comparación con los conductos de 1, 2 y 4 canales, pero también da 35 resultados razonables. El diámetro exterior del conducto para nervios puede ser de hasta 1 cm, con un diámetro interior de los canales que varía entre 50 μm y 4000 μm . Para un conducto de 2 mm, el diámetro interior de los canales puede ser de 50 a 700 μm , de preferencia de 530 μm .

Convenientemente, el colágeno es colágeno de tipo I, tal como colágeno de tendón de bovino.

40 El procedimiento puede comprender además la inmovilización de biomoléculas al colágeno. Las biomoléculas pueden estar seleccionadas de ácidos nucleicos tales como ADN de plásmido y ARN interferente pequeño (siRNA), o péptidos o laminina, y factor de crecimiento nervioso (por ejemplo, NGF o NT-3). Las biomoléculas tales como péptidos, factores de crecimiento o ADN de plásmido pueden cargarse en los conductos de colágeno. En este enfoque, las moléculas pueden difundir físicamente y unirse a los conductos de colágeno. En la condición *in vivo*, los factores de crecimiento o el ADN de plásmido puede eluir desde el conducto e interactuar con las células del tejido. Como alternativa, la estructura química del colágeno contiene gran cantidad de grupos carboxílicos (-COOH) y 45 grupos amina (-NH₂), que se pueden unir de manera covalente a polímeros sintéticos o naturales que pueden complejar factores de crecimiento o ADN de plásmido. A continuación, con la degradación del colágeno, el factor de crecimiento o el ADN de plásmido podría liberarse *in vivo*.

En otro aspecto, la invención proporciona un conducto para nervios multicanal reticulado de colágeno producido siempre por medio de un procedimiento según se describió anteriormente.

50 **Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1. Conductos de colágeno con (A) o sin (B) el borde utilizado para la sutura durante la implantación. (C) Representación esquemática de un conducto de colágeno de 7 canales en los moldes de alambre con los extremos terminales. La región de los conductos de colágeno y los moldes entre las flechas se demuestran en cada etapa de fabricación en (D). (D) El procedimiento de fabricación de un conducto de colágeno de 7 canales paso a paso.

Fig. 2. Porcentaje de degradación de muestras de colágeno después de 48 horas de exposición a la disolución de colagenasa a 37 °C, que demuestra una alta estabilidad de reticulación con EDC 30 mM.

Fig. 3. Moles de grupos NH₂ libres del ensayo de ninhidrina en películas y conductos de colágeno. (*, p < 0,01 frente a todos; §, p < 0,01 frente a todos excepto C7; #, p < 0,01 frente a todos excepto C7 y 10CF; +, p < 0,01 frente a todos excepto C1 y C4; V, p < 0,05 frente a todos excepto C4.)

Fig. 4. Temperaturas de contracción (desnaturalización) para películas de colágeno y conductos para nervios de colágeno a partir de mediciones de DSC que demuestran una alta estabilidad de reticulación con EDC 30 mM (*, p < 0,05 frente a todos; §, p < 0,05 frente a todos excepto 60C1, 60C4 y 60C7, #, p < 0,05 frente a CF, C1, C4, C7, 30C1, 30C4, 30C7, 60CF, 60C1, NeuraGen®; +, p < 0,05 frente a todos, V, p < 0,05 frente a todos excepto 60X1; Δ, p < 0,05 frente a todos excepto 10CF, 10C1, 10C4, 10C7, 60CF, 60C4, 60C7; , p < 0,01 frente a CF, C1, C4, C7, 30C1, 30C4, 30C7, 60CF, NeuraGen®; v, p < 0,01 frente a todos excepto 60CF)

Fig. 5. Crecimiento de neuritas a partir de ganglios de la raíz dorsal (DRG) después de dos días de cultivo sobre películas de colágeno reticuladas con EDC y NHS. Imagen de DRG en la película de colágeno no reticulado (A) y en las películas 10CF (B), 30CF (C) y 60CF (D). Escala de barras en (A), 1 mm (la misma escala para B, C y D). (E) Crecimiento axonal a partir de un DRG en crecimiento en la película 30CF. Escala de barras, 200 μm. (F) Análisis de la longitud de las neuritas a partir del DRG que se cultivaron en las películas de colágeno reticulado. (*, p < 0,05, n > 20 por grupo).

Fig. 6. La morfología de los conductos de colágeno reticulado de 1, 4 y 7 canales y los conductos Integra después de la incubación en PBS a 37 °C. (A) Las imágenes transversales de los conductos multicanal. Los conductos multicanal de colágeno mantuvieron la morfología de los canales después de 30 días de incubación en PBS a 37 °C. Escala de barras, 1 mm. (B) Las imágenes longitudinales de los conductos multicanal. Escala de barras, 5mm.

Fig. 7. Análisis del estudio de hinchamiento para los conductos de colágeno reticulado de 1, 4 y 7 canales y los conductos de colágeno Integra. El cambio de morfología de los conductos de colágeno se midió en función del peso (A), la longitud (B), la anchura (C) y el área del canal (D) del tubo en los siguientes puntos temporales: antes de la incubación (día 0), tras 1 día, 7 días y 30 días de incubación en PBS a 37 °C.

Fig. 8. Estudio de compresión de los conductos de colágeno. Curvas de carga y descarga representativas de fuerza de compresión-desplazamiento para los conductos 30C1 (A) y 30C7 (B) que demuestran un comportamiento no lineal con histéresis pero retroceso elástico completo. (C) Curva representativa de fuerza de compresión-desplazamiento para cada tipo de conducto de colágeno (solamente carga). (D) Rigidez estructural a la compresión transversal de los conductos de colágeno entrecruzado. *, p < 0,01, frente a los conductos 30C1, 30C4 y 30C7. §, p < 0,01, frente a los conductos 30C1.

Fig. 9. Estudio de tracción de los conductos de colágeno. (A) Curvas representativas de fuerza de tracción-desplazamiento para cada tipo de conducto de colágeno. (B) Rigidez estructural a la tracción de los conductos de colágeno entrecruzado. *, p < 0,05 frente a los conductos 30C1. (C) Resistencia a la ruptura de los conductos (fuerza máxima obtenida). *, p < 0,01 frente a los conductos 30C1.

Fig. 10. Prueba de flexión de tres puntos de los conductos de colágeno. (A) Curva representativa de fuerza-desplazamiento de la flexión de tres puntos para cada tipo de conducto de colágeno. (B) Rigidez a la flexión de los conductos de colágeno entrecruzado. *, p < 0,01.

Figura 11. Imágenes microscópicas (5 aumentos) de las secciones teñidas con azul de toluidina tomadas a través de la parte central de un conducto de colágeno de 1 (A), 2 (B), 4 (C) y 7 (D) canales, del conducto NeuraGen® de un solo canal (E) y del autoinjerto (F). Escala de barras, 500 μm.

Figura 12. Imágenes microscópicas (40 aumentos) de las secciones teñidas con fenilendiamina al 1 % tomadas a través de la parte central de un autoinjerto (A), conductos de colágeno de 1 (B), 2 (C), 4 (D) y 7 (E) canales y de un conducto NeuraGen® de un solo canal. Escala de barras, 30 μm.

Figura 13. Resultados de la morfometría del nervio después de la reparación con autoinjerto, conducto de colágeno de 1, 2, 4 y 7 canales y conducto NeuraGen® para (A) el número medio de fibras mielinizadas (*, p < 0,01, frente a todos los grupos de conductos), (B) la densidad media de fibras mielinizadas (*, p < 0,05, frente a los grupos con autoinjerto, con injerto de tubo de un solo canal y de 4 canales, §, p < 0,01, frente a todos los otros grupos), (C) el tamaño medio de la fibra mielinizada (*, p < 0,01, frente a los conductos de 2 canales, 7 canales y NeuraGen®, §, p < 0,05, frente al grupo con el conducto NeuraGen®), (D) el grosor medio de la mielina (*, p < 0,05, frente a los grupos con conducto de 7 canales y NeuraGen®, §, p < 0,05 frente al grupo con el conducto NeuraGen®). Escala de barras, 30 μm.

Figura 14. Resultados de la amplitud media de los potenciales de acción muscular compuestos registrados en el músculo plantar y dorsal de la pata, respectivamente, en el grupo experimental 1 (A y B). En los paneles C y D también se presentan los resultados de las amplitudes de CMAP en los animales del grupo experimental 2 que fueron entrenados con una cinta de andar (*, p < 0,05).

Figura 15. A-D: Imágenes de microscopía de fluorescencia (10 aumentos, filtro DAPI) de la sección longitudinal tomada a través del cuerno anterior después de la reparación con autoinjerto (A), de la reparación con conducto de 1 canal (B), 2 canales (C) y 4 canales (D). E-H: Imágenes de microscopía de fluorescencia (20 aumentos, filtro DAPI) de (E) un perfil marcado únicamente con FB (con citoplasma azul y núcleo oscuro, flecha a), (F) un perfil marcado únicamente con DY (con núcleo amarillo y citoplasma oscuro, flecha b) y (G y H) perfiles doblemente marcados con FB-DY (con núcleo amarillo y citoplasma azul. G, flecha c; H, flecha d). I: Resultados del rastreo simultáneo para el número medio de perfiles marcados con FB, DY y doblemente marcados con FB-DY después de la reparación con autoinjerto y con conductos de 1, 2 y 4 canales. J: Resultados del rastreo simultáneo para los porcentajes de proyecciones dobles después de la reparación con autoinjerto y con conductos de 1, 2 y 4 canales (*, $p < 0,05$, frente a los grupos con conducto de 2 canales y 4 canales). Escala de barras, 200 μm .

Descripción detallada de los dibujos

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Fabricación de conductos para nervios multicanal de colágeno

En el presente estudio, se diseñaron conductos de un solo canal y conductos multicanal con dimensiones adecuadas para un modelo de reparación del nervio ciático de rata. Se construyeron moldes cilíndricos "negativos" con 4 o 7 hilos que se extendían hasta los extremos terminales o retenedores para crear canales para la orientación del nervio. Los diámetros interiores de los canales (determinados por los diámetros exteriores del alambre) para los moldes de 4 y 7 canales eran de 530 μm y 410 μm , respectivamente. La distancia entre los dos extremos terminales de cada molde era de 1 cm. La figura 1A muestra una representación esquemática de un conducto de colágeno de 7 canales en un molde. Para la reparación de nervios, los conductos se fabricaron con un borde de 1 mm en cada extremo (figura 1B) para la inserción y la sutura del muñón del nervio. Los conductos sin labios se fabricaron para los estudios de caracterización in vitro (figura 1 C). El procedimiento para fabricar el conducto de colágeno de 7 canales se muestra de manera esquemática en la figura 1D. Se insertaron dos alambres de acero inoxidable en los canales en los dos extremos terminales y se dejó que una disolución de colágeno con una concentración de 12 mg/ml (derivado de tendón de Aquiles bovino mediante extracción con ácido y pepsina) se autoensamblara de manera uniforme alrededor de los alambres y se secó al aire. Se insertaron otros dos alambres en los dos canales adyacentes y se dejó autoensamblar la disolución de colágeno alrededor de los alambres y se secó al aire. Se insertaron dos alambres en los siguientes dos canales de los dos moldes y una vez más se colocó la disolución de colágeno alrededor de los alambres y se secó al aire. Por último, se insertó uno de los alambres en el canal restante de los dos moldes y se colocó la disolución de colágeno alrededor de toda la construcción de alambre y colágeno seco. Se dejó autoensamblar la disolución de colágeno alrededor del alambre y se secó al aire (figura 1D). El conducto de 4 canales se fabricó de una forma análoga con solo 4 alambres.

Para fabricar un borde sobre el conducto para realizar la sutura, se colocó disolución de colágeno alrededor de toda la construcción de alambre y colágeno seco y también 1 mm de los retenedores en cada extremo (figura 1C). Después de retirar los alambres y los retenedores, queda formado un borde en cada extremo del conducto. El procedimiento para fabricar el conducto de colágeno de 7 canales se muestra de manera esquemática en la figura 1D. Se insertaron dos alambres de acero inoxidable en los canales en los dos retenedores extremos terminales y se dejó que una disolución de colágeno con una concentración de 12 mg/ml (derivado de tendón de Aquiles de bovino mediante extracción con ácido y pepsina) se autoensamblara de manera uniforme en los alambres y se secó al aire. Se insertaron otros dos alambres en los dos canales adyacentes y se dejó autoensamblar la disolución de colágeno alrededor de los alambres y se secó al aire. Se insertaron dos alambres en los siguientes dos canales de los dos moldes y una vez más se colocó la disolución de colágeno alrededor de los alambres y se secó al aire. Por último, se insertó uno de los alambres en el canal restante de los dos moldes y se colocó la disolución de colágeno alrededor de toda la construcción de alambre y colágeno seco. Se dejó autoensamblar la disolución de colágeno alrededor del alambre y se secó al aire (figura 1D).

Para fabricar el conducto de 1 canal, se vertió la disolución de colágeno sobre un único alambre de acero inoxidable (diámetro 1,5 mm) y se secó al aire. Para mejorar la resistencia mecánica del conducto, podría aumentarse el espesor de la pared del conducto mediante la colocación de más de colágeno alrededor de todo el conducto de alambre y colágeno seco y posterior secado al aire.

El conducto de colágeno secado al aire en los alambres se trató a continuación con una disolución de reticulación de EDC (10, 30 o 60 mM) y NHS (1-30 mM) en disolución de MES (1-100 mM, pH 5,5) durante la noche. Después de lavar con NaH_2PO_4 (0,1-0,2 M) y agua destilada, se liofilizó el colágeno sobre los alambres. Los moldes y los alambres de los conductos de colágeno se retiraron después de la liofilización.

Se fabricaron películas de colágeno mediante la dispersión de la disolución de colágeno sobre una superficie plana de Teflon (barqueta de pesada) secado al aire. Las películas de colágeno se reticularon a continuación con EDC y NHS como anteriormente. Los conductos para nervios de colágeno NeuraGen® (NeuraGen®, Integra Life Sciences Corporation, EE.UU.), que se han utilizado en la práctica clínica, sirvieron como control de conductos un solo canal.

Terminología

La película de colágeno no reticulado, los conductos de colágeno de 1, 4 y 7 canales reciben la denominación CF, C1, C4 y C7, respectivamente. La película de colágeno, los conductos de colágeno de 1, 4 y 7 canales que están reticulados con EDC 10 mM/NHS 10mM, EDC 30 mM/NHS 10 mM o EDC 60 mM/NHS 10 mM reciben la denominación 10CF, 10C1, 10C4, 10C7, 30CF, 30C1, 30C4, 30C7, 60CF, 60C1, 60C4 y 60C7, respectivamente.

Degradación con colagenasa

Para estudiar el perfil de degradación de los conductos de colágeno, se utilizó la enzima colagenasa tipo II bacteriana, derivada de Clostridium histolyticum (Sigma: C6885, EC 3.4.24.3). La enzima se disolvió en una disolución tampón de Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) que contenía CaCl₂ 0,005 M y NaN₃ 0,05 mg/ml. Se utilizó una concentración de 5 U de colagenasa por mg de muestra de colágeno. Después de 3 horas, 24 horas y 48 horas de incubación de las muestras con disolución de enzima, se centrifugaron las muestras a 4 °C y el sedimento remanente se lavó repetidamente con agua destilada y posteriormente se liofilizó. A continuación se pesaron las muestras. La figura 2 ilustra el porcentaje de degradación de las muestras de colágeno y colágeno reticulado en presencia de la enzima colagenasa en función del tiempo.

Contenido de grupos amina libres

Se cortaron los conductos de colágeno y la película de colágeno tratados con diferentes concentraciones de EDC y NHS se cortaron en porciones con un peso de aproximadamente 2 mg y se colocaron en tubos eppendorf. A cada tubo se le añadieron 200 µl de agua destilada y 1 ml de disolución de ninhidrina. Los tubos se incubaron en la oscuridad a 95-100 °C durante 30 minutos. A continuación, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadieron 250 µl de cada muestra a 1 ml de disolución de isopropanol al 50 %. Las disoluciones se agitaron a continuación en el vórtex y se analizaron utilizando el NanoDrop a una longitud de onda de 570 nm. La disolución de ninhidrina se preparó mezclando un tubo de ninhidrina al 4 % en 2-etoxietanol y otro tubo de ácido cítrico 200 mM (cloruro de estaño II al 0,16 % p/v, pH 5,0). Se mezcló meticulosamente el contenido de los dos tubos e inmediatamente se añadió a las muestras.

Temperatura de contracción

La temperatura de contracción de las muestras de conductos de colágeno y de película de colágeno se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las medidas calorimétricas se realizaron con un instrumento DSC-60 (Shimadzu Europe Ltd., Duisburg, Alemania). Las muestras de los conductos de colágeno (6 mg) se sumergieron en PBS a 4 °C durante la noche. Las muestras húmedas se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua y se sellaron herméticamente en recipientes de aluminio. El calentamiento se mantuvo a una velocidad de 5 °C/min en el intervalo de temperaturas de 25 a 95 °C y se usó un recipiente de aluminio vacío como sonda de referencia. La temperatura de contracción (T_c) se determinó como el valor de inicio del pico endotérmico producido. Se realizaron tres mediciones independientes de las muestras por cada composición de matriz.

Efecto de la reticulación con EDC y NHS sobre el crecimiento de neuritas a partir de los ganglios de la raíz dorsal

Los procedimientos utilizados en los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité institucional de protección y utilización de animales y completados en la Clínica Mayo (Rochester, MN, EE.UU.). Se aislaron ganglios de la raíz dorsal (DRG) de embriones de rata de 14 días de edad y se cultivaron en películas CF, 10CF, 30CF y 60CF. Después de 2 días de cultivo en MEM (medio esencial mínimo, Gibco) suplementado con suero de ternera al 10 %, factor de crecimiento nervioso (NGF, 8 ng/ml), glucosa (al 0,6 % p/v) y L-glutamina (1,4 mM; Sigma) a 37 °C, los DRG se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Los cultivos de DRG se incubaron a continuación con anticuerpo anti-tubulina III (1:200, MsX Tubulin BetaIII Isoform, Milipore) durante la noche a 4 °C. Después del lavado, las células se incubaron con IgG anti-ratón de cabra conjugada con Cy3 (1:200, Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las imágenes de los DRG fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Axiovert 200M; Carl Zeiss, Inc.).

Las mediciones de crecimiento radial de las neuritas se realizaron utilizando el programa informático NIH Image J. La longitud de las neuritas se midió desde el centro del ganglio hasta el borde del proceso neuronal más largo como se ha descrito previamente [Ta, 2006]. La longitud media de las neuritas (en mm) se calculó a partir de los explantes de tres experimentos independientes.

Hinchazón de los conductos

Se colocaron conductos 30C1, 30C4 y 30C7 y el conducto de colágeno Integra en disolución tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C. Se estudiaron el peso, la longitud, la anchura y el área del canal de los conductos en los siguientes puntos temporales: inmediatamente antes de la incubación y en el día 1, día 7 y día 30 después de la incubación con PBS a 37 °C. La longitud y anchura de los conductos se midieron por medio de un calibre digital (Mitutoyo, Aurora, IL, EE.UU.). El área del canal se analizó con un programa informático Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EE.UU.). Las imágenes de los conductos de colágeno en los puntos

temporales anteriores se tomaron usando un estereomicroscopio (Nikon SMZ800, Nikon Corporation, Japón) con una cámara digital (cámara Nikon digital sight DS-Fil, Nikon Corporation, Japón).

ESTUDIOS MECÁNICOS DE CARACTERIZACIÓN

5 Las propiedades mecánicas de los conductos multicanal de colágeno se caracterizaron por medio de las pruebas de compresión, tracción y flexión de 3 puntos. Las pruebas de compresión y tracción se realizaron en los conductos de colágeno 30C1, 30C4, 30C7 y en conductos comerciales utilizando una máquina de pruebas uniaxial (ELF 3200 Endura-Tec, Schaumburg, IL), y las pruebas de flexión de tres puntos se llevaron a cabo usando un analizador dinámico mecánico (DMA 2980, TA Instruments, New Castle, DE). Las muestras se incubaron en PBS (a 37 °C) durante la noche antes de la prueba. Todas las pruebas se realizaron inmediatamente después de retirar las muestras de la incubadora.

15 La prueba de compresión transversal se realizó en conductos con una longitud de 10 mm. Los diámetros medios de los conductos 30C1, 30C4, 30C7 y de los conductos comerciales eran de $2,29 \pm 0,02$ mm, $1,83 \pm 0,01$ mm, $1,81 \pm 0,04$ mm y $1,80 \pm 0,03$ mm, respectivamente. Se aplicó un desplazamiento perpendicular al eje longitudinal del conducto a una velocidad de la cruceta de 6 mm/min para un desplazamiento final de 1,2 mm (aproximadamente el 60 % del diámetro de los conductos), y se registraron la fuerza, F, y el desplazamiento, d. La rigidez estructural a la compresión transversal se calculó a partir de la porción lineal inicial de la curva F-d usando regresión lineal.

20 Para llevar a cabo la prueba de tracción, se colocó cada conducto de colágeno en las abrazaderas de ajuste manual. La distancia entre las abrazaderas se fijó en 10 mm, y los conductos se estiraron a una velocidad de 10 mm/min al tiempo que se registraron la fuerza y el desplazamiento. La rigidez estructural a la tracción se calculó a partir de la porción lineal inicial de la curva F-d usando regresión lineal y la fuerza se registró como la mayor fuerza alcanzada durante la prueba.

25 Para las pruebas de flexión de tres puntos, se colocaron conductos de 15 mm intactos en el soporte en dos puntos separados entre sí por 1 cm (es decir, L = 10 mm). En un tercer punto a medio camino entre estos, se aplicó una fuerza en aumento sobre la muestra desde la parte superior (figura 10A). La rigidez a la flexión, EI, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$EI = (F/d) (L^3/48)$$

en la que la mejor estimación de la pendiente (F/d) se determinó por regresión lineal a partir de la porción inicial (lineal) de la curva de fuerza-desplazamiento.

Animales, procedimientos y grupos experimentales

30 En este estudio se utilizaron un total de 72 ratas Lewis hembras adultas, con un peso de entre 190 y 220 gramos. En el primer grupo experimental, para el estudio de morfometría del nervio y registros del CMAP, se asignaron aleatoriamente 48 ratas a 6 subgrupos: autoinjerto, conductos de colágeno de 1, 2, 4 y 7 canales y el conducto comercial de colágeno de un solo canal (NeuraGen[®], Integra Life Sciences Corporation, EE.UU.). En el segundo grupo experimental, para los estudios de marcaje retrógrado simultáneo, análisis del movimiento del tobillo y registros del CMAP, se asignaron aleatoriamente 24 ratas a cuatro subgrupos: autoinjerto, conductos de 1, 2 y 4 canales. En este último grupo, se realizó entrenamiento en cinta de andar (velocidad de carrera 15 m/min, duración 10 minutos), una semana después de la operación, y posteriormente cuatro veces por semana durante ocho semanas en total para prevenir la formación de contracturas.

Procedimiento quirúrgico

40 Las ratas fueron anestesiadas con ketamina 80 mg/kg y 5 mg/kg de xilazina, que se inyectó por vía intraperitoneal. La disección se realizó con la ayuda de un microscopio quirúrgico Zeiss (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Alemania). Se expuso y se aisló el nervio ciático izquierdo a nivel de la mitad del muslo utilizando un enfoque dorsal-lateral. Se resecó un segmento de 5 mm del nervio ciático antes de la bifurcación del nervio en las ramas tibial y peroneal del nervio. Se insertó 1 mm de los extremos del nervio proximal y distal en los tubos de 12 mm de longitud con suturas monofilamento de nylon 10-0 (Ethilon; Ethicon, Inc., Piscataway, NJ). La herida se cerró en capas (figura complementaria 1). El mismo procedimiento se realizó para la reparación por injerto de nervio autólogo, excepto en que se cortó transversalmente un segmento de 1 cm de nervio ciático y se reparó mediante microcirugía con suturas monofilamento de nylon 10-0.

Morfometría del nervio

50 Después de 16 semanas de la implantación, en todos los animales del primer grupo experimental, se volvió a exponer el injerto y se fijó in situ con una disolución de Trump (formaldehído al 4 % y glutaraldehído al 1 % en disolución tamponada con fosfato) durante 30 minutos. Se resecó el injerto y se colocó en el mismo fijador durante toda la noche. Se recogieron las muestras (2 mm) en el punto medio del injerto y se incluyeron en resina de Spurr. Se cortaron secciones (1 μ m) con una cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo (EMUC6 ultracut de Leica, Wetzlar, Alemania). Se tiñeron las secciones de cada muestra con azul de toluidina o fenilendiamina al 1 % para el estudio de

morfometría del nervio. La morfometría del nervio se realizó en un sistema de análisis de imágenes. Brevemente, se extrajeron manualmente del borde interior y exterior de las fibras mielinizadas al menos 500 fibras mielinizadas a 63 aumentos en áreas seleccionadas al azar en el portaobjetos para determinar el número de fibras mielinizadas, la densidad de las fibras mielinizadas, el diámetro medio de las fibras mielinizadas y el grosor medio de la mielina.

5 Registro del potencial de acción muscular compuesto

En todos los animales de ambos grupos experimentales, se registraron los CMAP antes de la operación y a las 6, 8, 10, 12 y 16 semanas después de la implantación del conducto para nervios. Brevemente, en primer lugar los animales fueron anestesiados con el procedimiento descrito anteriormente (procedimiento quirúrgico), a continuación se registraron los CMAP con una máquina de electromiografía (Nicolet Viking IV; Viasys Healthcare, Inc., Conshohocken, PA) en los músculos del pie inervados por el nervio tibial y peroneo de la extremidad izquierda. Se colocaron los electrodos de aguja de registro en los músculos plantar o dorsal del pie mencionados a electrodos de aguja colocados distalmente en los dedos del pie. Se colocaron los electrodos de estímulo de aguja directamente en la parte posterior de la tibia con aproximadamente 5 mm de separación entre el cátodo distal y el ánodo proximal. Los electrodos de estímulo se ajustaron localmente para producir la amplitud máxima del CMAP. El estímulo se incrementó gradualmente para producir una respuesta supramáxima. Se registraron los CMAP y se analizaron para determinar la amplitud del potencial de acción.

Marcaje retrógrado simultáneo

En el segundo grupo experimental, después de dieciséis semanas, todos los animales fueron anestesiados para el marcaje retrógrado simultáneo. Se expusieron el injerto del nervio y las ramas distales del nervio tibial y peroneo. En primer lugar, se cortó transversalmente el nervio peroneo y se colocó el extremo proximal en un vaso con disolución de diamidino amarillo (DY) al 5 % (EMS-Chemie, Männedorf, Suiza) durante 20 minutos. Después de eso, se limpió el extremo del nervio y a continuación se suturó y se cubrió por medio del tejido adiposo circundante para evitar la fuga del trazador y la contaminación cruzada. Posteriormente, se cortó transversalmente el nervio tibial y se colocó el extremo proximal del nervio en un vaso con disolución de azul rápido (FB) al 5 % (EMS-Chemie, Männedorf, Suiza) durante 20 minutos. Una vez más, se limpió el extremo del nervio y a continuación se suturó y se cubrió por medio del tejido adiposo circundante. Seis días después de la aplicación del trazador, se perfundieron los animales por vía transcardiaca con paraformaldehído al 4 % y sacarosa al 10 % en disolución tamponada con fosfato (PBS). Se extirparon los segmentos L1 a L6 de la médula espinal y se fijaron posteriormente durante toda la noche. Se cortaron secciones sagitales longitudinales de 30 μ m de grosor en un criostato (LEICA Cryostat, CM3050S, Nussloch, Alemania) a -20 °C. Las secciones se evaluaron inmediatamente bajo un microscopio de fluorescencia (Axioplan 2; Carl Zeiss, Inc.). Se contaron los perfiles neuronales con citoplasma azul y un núcleo oscuro como marcados con FB, los perfiles con un núcleo de color amarillo y el citoplasma oscuro como marcados con DY, y los perfiles con un núcleo de color amarillo y citoplasma azul como perfiles doblemente marcados con FB-DY. Se contaron todos los perfiles de todas las secciones.

35 Estadística

Los datos se expresaron como medias \pm DE y se analizaron mediante ANOVA unidireccional con un paquete de software SPSS17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los valores p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

40 *Los conductos multicanal de colágeno reticulados con EDC 30 mM y NHS 10 mM mostraron un bajo contenido de grupos amina, alta estabilidad térmica y resistencia máxima a la colagenasa*

En la figura 2 se muestra el porcentaje en peso de las muestras de colágeno restante después de la degradación con colagenasa como una función del tiempo. La reticulación con EDC y NHS redujo significativamente la tasa de degradación de los conductos de colágeno por la colagenasa. Después de 3 horas de digestión, el peso de las películas, los conductos y conductos comerciales de colágeno no reticulado disminuyó significativamente en comparación con los conductos y las películas de colágeno reticulados con EDC/NHS ($P < 0,01$). La tasa de degradación de los conductos 30C1, 30C4 y 30C7 fue significativamente menor que la de todas las otras muestras después de 48 horas de digestión ($P < 0,01$). El peso de todos los conductos de colágeno reticulado disminuyó a una velocidad más baja en todos los puntos temporales en comparación con el de la película de colágeno reticulado y el del conducto de colágeno comercial ($P < 0,01$). La reticulación con EDC/NHS disminuyó el número de grupos amino libres de los conductos de colágeno debido a la formación de enlaces amida entre grupos amina y carboxilo. Los resultados de la evaluación cuantitativa del contenido de grupos amina se muestran en la figura 3. La película CF mostró una cantidad significativamente más alta de grupos amina libre ($6,11 \pm 0,08$ mmol) en comparación con las películas y los conductos de colágeno reticulados con EDC/NHS y los conductos de colágeno no reticulado ($P < 0,01$). Los conductos de colágeno no reticulado y la película 10CF mostraron significativamente más cantidad de grupos amina libre que la 60CF, 30CF y todos los conductos reticulados ($P < 0,05$). No hubo diferencia estadística entre los conductos reticulados con EDC 10, 30 y 60 mM. Las temperaturas de contracción de los conductos y películas de colágeno no reticulados fueron significativamente más bajas que las de los conductos y

películas de colágeno reticulados ($P < 0,01$) y la del conducto comercial ($P < 0,05$) (figura 4). La temperatura de contracción de los conductos de colágeno reticulados con EDC 30 mM y NHS 10 mM fueron significativamente más elevadas que las de todas las otras muestras ($P < 0,05$). El conducto comercial y la película 60CF mostraron temperaturas de contracción significativamente inferiores a las de los otros conductos y películas de colágeno reticulados ($P < 0,05$).

La reticulación con EDC hasta 30 mM no influyó de manera negativa sobre el crecimiento axonal del cultivo de explantes de DRG

Las películas de colágeno reticulado con EDC/NHS soportaron el crecimiento de los explantes de DRG. La morfología de las células, que se muestra en la figura 5, demuestra que los DRG crecieron en las películas de colágeno reticulado y no reticulado y formaron neuritas. Los explantes de DRG mostraron longitud de neuritas similar cuando se cultivaron en las películas CF, películas 10CF y películas 30CF, mientras que en las películas 60CF la longitud de las neuritas fue más corta (fig. 5A-E). La longitud media de las neuritas para los DRG cultivados en películas CF ($1,09 \pm 0,23$ mm) fue significativamente mayor que la de las películas 60CF ($0,89 \pm 0,24$ mm, $P < 0,05$), pero no se encontraron otras diferencias significativas (fig. 5F). Se usaron más de 20 DRG para la medición de la longitud de las neuritas en cada grupo ($N = 26, 22, 23$ y 30 para la CF, 10CF, 30CF y 60CF, respectivamente).

Los conductos multicanal de colágeno mantuvieron la geometría del canal en los estudios de hinchamiento

Después de un día de incubación en PBS, la anchura y el peso de todos los conductos de colágeno aumentaron significativamente ($P < 0,01$); no se observaron cambios significativos después del día 1 (figuras 6 y 7). La longitud de los conductos 30C1, 30C4 y del conducto comercial no cambió significativamente durante el período de incubación, sin embargo, la longitud de los conductos de 7 canales aumentó significativamente después de la incubación de 1 día en PBS ($P < 0,05$); no se observaron otros cambios significativos después de 1 día. Al día 30, la longitud de los conductos no mostró variación significativa entre los tipos de conductos. El área del canal de los conductos de 4 y 7 canales no mostró cambios significativos después de la incubación de 30 días. El área del canal se normalizó mediante el cálculo de la relación del área abierta total de cada conducto (en píxeles) al área media de los conductos de 1 canal en el día cero (antes de la incubación). El área del canal de los conductos de 1 canal aumentó significativamente ($P < 0,05$) después de la incubación de 1 día, sin cambios posteriores. El área del canal de los conductos comerciales disminuyó significativamente después de la incubación 1 día ($P < 0,05$); no se observaron otros cambios significativos con el transcurso de la incubación.

Los conductos multicanal de colágeno mostraron una mayor rigidez y resistencia mecánicas que los conductos de colágeno de un solo canal

Los resultados del análisis de fuerza de compresión transversal-desplazamiento se muestran en la figura 8. Los datos de fuerza de compresión-desplazamiento para todos los tipos de conductos mostraron la clásica curva en forma de J característica de los tejidos blandos de colágeno con histéresis sustancial entre las curvas de carga y de descarga (figuras 8A y 8B). Se observó recuperación completa de las dimensiones iniciales sin evidencia alguna de deformación plástica o aplastamiento. Las curvas de carga representativas se muestran en las figuras 8C y 8D; nótese que el conducto comercial y las muestras 30C1 también aumentaron la rigidez de manera no lineal en desplazamientos mayores de 1,2 mm. Para relevancia fisiológica, se analizó la porción lineal inicial de las curvas antes de la región puntera en lugar de la pendiente máxima. La rigidez estructural a la compresión transversal del conducto comercial fue de $0,92 \pm 0,15$ N/mm ($N = 4$), que fue significativamente mayor que la de los conductos 30C1 ($0,24 \pm 0,04$ N/mm, $N = 4$), 30C4 ($0,43 \pm 0,11$ N/mm, $N = 4$) y 30C7 ($0,56 \pm 0,11$ N/mm, $N = 4$) ($P < 0,01$). La rigidez a la compresión del conducto 30C7 fue significativamente mayor que la de los conductos 30C1 ($P < 0,01$).

Las pruebas de tracción mostraron que la rigidez estructural a la tracción de los conductos 30C7 ($3,59 \pm 0,70$ N/mm, $N = 8$) fue significativamente mayor que la de los conductos 30C1 ($2,57 \pm 0,66$ N/mm, $N = 9$, $p < 0,05$). La rigidez a la tracción de los conductos 30C4 ($3,48 \pm 0,80$ N/mm, $N = 8$) y de los conductos comerciales ($2,38 \pm 0,86$ N/mm, $N = 3$) no fue significativamente diferente de la de los 30C1 y conductos 30C7. La fuerza aplicada al conducto comercial en el punto de fallo ($6,89 \pm 2,6$ N) fue significativamente mayor que la del conducto 30C1 ($3,15 \pm 1,25$ N, $P < 0,01$). Las fuerzas en el punto de fallo de los conductos 30C4 y 30C7 no fueron significativamente diferentes de las de los conductos 30C1 y comercial (figura 9).

Los datos del estudio de flexión de tres puntos se muestran en la figura 10B. La rigidez a la flexión de los conductos 30C1 ($0,77 \pm 0,28$ Nmm², $N = 6$) fue significativamente menor que la de los conductos 30C4 ($1,88 \pm 0,35$ Nmm², $N = 6$, $P < 0,01$) y 30C7 ($2,13 \pm 0,54$ Nmm², $N = 6$, $P < 0,01$). La rigidez a la flexión de los conductos 30C4 y 30C7 no fue significativamente diferente. Todas las muestras volvieron a sus dimensiones originales tras retirar la carga después de la flexión máxima (> 5 mm de deflexión).

Morfometría del nervio

Se observó regeneración satisfactoria (definida por la presencia de axones mielinizados en el medio del conducto) en 39 de 40 casos de reparación por medio de conducto (en un injerto de conducto de 2 canales sólo estaba presente tejido fibroso). Las figuras 11 y 12 muestran imágenes microscópicas (tomadas con 5 aumentos (figura 11) y 40 aumentos (figura 12)) de las secciones tomadas a través de la mitad de los 6 tipos de injertos.

El número medio de fascículos (canales llenos de axones mielinizados) fue de uno para los conductos de un solo canal, $1,6 \pm 0,8$ para los conductos de 2 canales, $3,75 \pm 0,4$ para los conductos de 4 canales y 6 ± 1 para los conductos de 7 canales. El número medio de fibras mielinizadas no fue significativamente diferente entre los grupos de conductos (figura 13A), pero fue significativamente mayor después de la reparación con autoinjerto (10.348 ± 1038 , frente a todos los grupos de conductos, $p < 0,01$). La densidad media de fibras mielinizadas (figura 13, parte B) fue significativamente mayor para el grupo con conductos de 2 canales (frente al autoinjerto, al conducto de un solo canal y al conducto comercial, $p < 0,05$), y significativamente menor para el grupo con el conducto comercial (frente a todos los otros grupos, $p < 0,01$).

El diámetro de las fibras mielinizadas (figura 13C) del grupo con el conducto de un solo canal ($4,37 \pm 0 \mu\text{m}$) fue significativamente mayor que el de los grupos con conductos de 2 y 7 canales y con conductos comerciales ($p < 0,01$). El diámetro de las fibras mielinizadas de los grupos con autoinjerto y con conductos de 4 canales ($4,08 \pm 0,37 \mu\text{m}$ y $4,27 \pm 0,19 \mu\text{m}$, respectivamente) fue significativamente mayor que el del grupo con injerto de conducto comercial ($3,64 \pm 0,20 \mu\text{m}$; $P < 0,05$). El grosor de la mielinización (figura 13D) del grupo con autoinjerto ($0,67 \pm 0,13 \mu\text{m}$) fue significativamente mayor que el del grupo con conductos de 7 canales ($0,57 \pm 0,03 \mu\text{m}$; $p < 0,05$) y el del grupo con conductos comerciales ($0,52 \pm 0,03 \mu\text{m}$, $p < 0,01$). El grosor de la mielinización de los grupos con conductos de 1 canal y de 4 canales ($0,66 \pm 0,07 \mu\text{m}$ y $0,64 \pm 0,005 \mu\text{m}$, respectivamente) fue significativamente mayor que el del grupo con conducto comercial ($p < 0,05$).

CMAP

En el primer grupo experimental para el estudio de morfometría del nervio y el registro de los CMAP, los primeros CMAP se detectaron seis semanas después de la reparación con autoinjerto y ocho semanas después de la reparación con el conducto de un solo canal (figuras 14A y B). La amplitud del CMAP de todos los grupos experimentales aumentó con el tiempo. A las doce semanas, la amplitud del grupo con autoinjerto en los músculos plantares y los músculos dorsales del pie ($2,08 \pm 0,94 \text{ mV}$ y $2,25 \pm 1,16 \text{ mV}$, respectivamente) fue significativamente mayor que la de los otros grupos ($p < 0,01$). A las dieciséis semanas, la amplitud del CMAP del nervio con autoinjerto en los músculos plantares y en los músculos dorsales del pie ($3,95 \pm 0,83 \text{ mV}$ y $3,38 \pm 1,18 \text{ mV}$, respectivamente) fue significativamente mayor que la de los grupos con conductos de 2, 4 y 7 canales y con conducto comercial ($p < 0,01$). La amplitud del CMAP de los grupos con conductos de 1 y 4 canales en los músculos plantares del pie ($2,35 \pm 0,80 \text{ mV}$ y $1,90 \pm 0,70 \text{ mV}$, respectivamente) fue significativamente mayor que la del grupo con el conducto de 7 canales ($0,63 \pm 0,56 \text{ mV}$, $p < 0,05$). La amplitud del CMAP del grupo con el conducto de 1 canal en los músculos dorsales del pie ($2,08 \pm 0,89 \text{ mV}$) fue significativamente mayor que la del grupo con el conducto de 7 canales ($0,38 \pm 0,44 \text{ mV}$, $p < 0,01$). La comparación de los CMAP a las dieciséis semanas que se realizó entre el primer grupo experimental sin entrenamiento en cinta de andar y el segundo grupo experimental con entrenamiento en cinta de andar se muestra en las figuras 14C y D.

La amplitud del CMAP del grupo con 4 canales en los músculos plantares del pie ($3,43 \pm 0,70 \text{ mV}$) con entrenamiento en cinta de andar fue significativamente mayor que la del grupo sin entrenamiento ($p < 0,05$).

Marcaje retrógrado simultáneo

Después de la reparación con autoinjerto y con conductos de 1, 2 y 4 canales, los perfiles marcados con FB, DY y FB-DY en el asta anterior de la médula espinal se encontraron entremezclados. Las imágenes de los perfiles con diferente marcaje se proporcionan en la figura 15. El número total de perfiles marcados no fue significativamente diferente después de la reparación con conductos de 1, 2 y 4 canales, pero fue significativamente mayor después de la reparación con autoinjerto ($p < 0,01$). El porcentaje de proyecciones dobles tanto a la rama tibial como a la peroneal del nervio se calculó dividiendo el número total de neuronas doblemente marcadas por el número total de neuronas (neuronas marcadas con un solo trazador y neuronas marcadas con los dos trazadores (DY y FB)). Es interesante destacar que el porcentaje de neuronas doblemente marcadas fue significativamente menor después de la reparación con conductos de 2 canales ($2,7 \% \pm 2,9 \%$) y de 4 canales ($2,4 \% \pm 1,5 \%$) en comparación con la reparación con los conductos de un solo canal ($7,1 \% \pm 2,7 \%$) (ambos $p < 0,05$), lo que indica una menor dispersión axonal después de la reparación con el tubo para nervios multicanal.

Discusión

En el diseño de la próxima generación de conductos para nervios, son deseables las siguientes características de los conductos. El biomaterial debe ser biocompatible. Los conductos deben ser flexibles y tener suficiente resistencia mecánica para resistir la compresión y el colapso. La degradación de los conductos debe programarse para que coincida con la tasa de regeneración del nervio. El proceso de fabricación del biomaterial debe ser sencillo y reproducible.

En este estudio, mediante el uso de una técnica única secuencial de moldeo y secado al aire en y/o con un procedimiento de reticulación optimizado, los inventores han fabricado una serie de conductos multicanal de colágeno con propiedades bioquímicas y mecánicas a medida que demostraron tener la compatibilidad celular requerida. La estabilidad dimensional, la tasa de degradación y las propiedades mecánicas del colágeno pueden regularse con una variedad de procedimientos de reticulación [Chau y col., 2005, Ben y col., 1988, Matsuda y col.,

1999, Dunn y col., 1969]. Sin embargo, los efectos citotóxicos de los agentes de reticulación tales como glutaraldehído, diisocianato de hexametileno y azidas de acilo están bien documentados. La EDC, un agente de reticulación hidrosoluble, de longitud cero, puede reticular las moléculas directamente y, con lavados repetidos con tampón y con agua, la EDC ha demostrado ser menos tóxico que estos agentes de reticulación formando "enlaces-puente".

Para cuantificar el grado de reticulación, se estudiaron los porcentajes de los grupos NH_2 libres restantes y la temperatura de contracción de las muestras de colágeno reticulado. El mecanismo de reticulación con EDC implica la activación de los grupos carboxílicos (-COOH) de los residuos de ácido glutámico y aspártico y la formación de enlaces amida (-CONH-) en presencia de grupos amina libres (- NH_2) de residuos de lisina o hidroxilisina. Como la reticulación con EDC implica la reacción entre los grupos -COOH libres y los grupos - NH_2 del colágeno para formar un enlace -CONH-, la reticulación reduce la cantidad de grupos NH_2 libres en las muestras de colágeno. La disminución de los grupos - NH_2 en las muestras de colágeno es coherente con el grado de reticulación del colágeno. El estudio por DSC mostró que la temperatura de contracción de las muestras de colágeno aumentó cuando la concentración de EDC aumentó de 10 mM a 30 mM. Esta observación es coherente con los hallazgos de los estudios con ninhidrina y sugiere que la reticulación con EDC 30 mM y NHS 10 mM crea el número máximo de puentes de reticulación. Este resultado es compatible con la máxima resistencia a la digestión con colagenasa de los conductos reticulados con EDC 30 mM y NHS 10 mM. El hinchamiento de los conductos de colágeno se observa a menudo en condiciones in vivo e in vitro. El hinchamiento inicial es el resultado de la absorción de agua. El hinchamiento puede causar problemas significativos en la aplicación in vivo, cuando deforma significativamente los conductos y disminuye el área del canal de los conductos. La deformación de las guías nerviosas puede impedir la extensión de la regeneración axonal. El grosor y las características de hinchamiento de los conductos de colágeno pueden controlarse por medio de la reticulación para aportar estabilidad al tubo. En este estudio los inventores observaron que la absorción de agua provocó la disminución significativa del área del canal de los conductos para nervios Integra después de la incubación de 1 día en PBS a 37 °C. Por el contrario, el área del canal del conducto de 1 canal no mostró cambios significativos. El control del hinchamiento de los conductos multicanal es crucial, ya que el hinchamiento del intervalo entre los canales puede provocar la disminución significativa del área del canal. Se ha demostrado el hinchamiento y la deformación de los conductos multicanal de poli(lactida-co-glicolida) en anteriores estudios in vitro e in vivo [de Ruiter y col., 2008b] y, por consiguiente, las cavidades de conducto se bloquearon. No se observó crecimiento de los nervios en los conductos bloqueados. Los conductos multicanal de colágeno fabricados en este estudio no mostraron una disminución del área del canal en la prueba in vitro y también pueden apoyar el crecimiento de los nervios en los estudios in vivo.

Las propiedades mecánicas de los conductos para nervios son importantes para mantener la integridad y la estabilidad en el sitio del injerto. Los conductos para nervios deben mantener la integridad estructural mientras se manejan y se implantan en la cirugía. Después de la cirugía, es necesario que los conductos proporcionen soporte biomecánico suficiente durante el proceso de regeneración del tejido nervioso. Específicamente, los conductos deben resistir la contracción muscular, el estiramiento y la distorsión. En este estudio, los conductos para nervios de colágeno fueron diseñados con el mismo tamaño de diámetro exterior y se fabricaron con una cantidad similar de materiales de colágeno. Los conductos multicanal mostraron una mayor rigidez estructural que la que mostraron los conductos de un solo canal en las pruebas de compresión, estiramiento y flexión. Si bien los conductos NeuraGen® mostraron una mayor rigidez a la compresión que los conductos multicanal de colágeno, la cantidad de colágeno necesario para fabricar los conductos de colágeno NeuraGen® es tres veces la de los conductos multicanal. Estos datos, combinados con la estabilidad dimensional en las pruebas de hinchamiento y la resistencia a la degradación enzimática en el ensayo de colagenasa, sugieren que los conductos multicanal reticulados con EDC 30 mM serán mecánicamente superiores a los conductos de un solo canal en lo que se refiere a resistencia a la deformación y mantenimiento de la geometría del canal in vivo.

Además de la rigidez estructural suficiente para resistir la carga externa, también se observó que los conductos se deforman elásticamente bajo estas cargas importantes. A diferencia de la deformación permanente observada en las pruebas de flexión de tres puntos de los conductos multicanal de PLGA [de Ruiter, 2008a], no se observó deformación plástica de los conductos multicanal a base de colágeno, incluso bajo grandes deformaciones. Además, en todos los casos, los inventores no observaron pruebas de deformación plástica o aplastamiento en los ensayos de compresión a la mitad del diámetro de los conductos. Combinados, estos resultados demuestran la elasticidad de los conductos bajo carga externa importante y sugieren que los conductos permanecerán flexibles en el entorno de implantación. La flexibilidad y la rigidez de los conductos multicanal pueden ajustarse aún más mediante la regulación del grosor de la pared y el número de canales.

El efecto citotóxico de los agentes de reticulación tales como glutaraldehído, diisocianato de hexametileno y azidas de acilo se ha informado anteriormente [Duan y col., 2005]. La EDC es menos tóxica que estos agentes de reticulación formadores de "enlaces-puente". El lavado repetido con tampón y agua puede eliminar los residuos citotóxicos en la matriz reticulada con EDC y NHS [Pieper y col., 1999; Van wachem y col., 1994; Nieuwenhuis y col., 1994a,b; Wissink y col., 2000]. Sin embargo, la alta concentración de EDC para la reticulación puede dar lugar a citotoxicidad debida a la limitación de grupos - NH_2 en el colágeno para la reacción de reticulación [Powell y Boyce, 2006]. Además, la citotoxicidad puede ser el resultado de la liberación inadecuada de las moléculas no utilizadas de EDC o sus subproductos de reacción procedentes de las matrices a través de simples técnicas de lavado. En este estudio, los inventores mostraron que no había diferencia significativa en el crecimiento de neuritas a partir de los

DRG que se desarrollaron en las películas de colágeno naturales y en las películas 10CF y 30CF. Sin embargo, el crecimiento de neuritas fue más corto a partir de los DRG que se desarrollaron en películas de colágeno entrecruzado con EDC 60 mM.

5 En este estudio, los inventores mostraron que casi todos los canales contenían fascículos con fibras mielinizadas. La cantidad de regeneración después de la reparación con los diferentes tipos de conductos no fue significativamente diferente a pesar de la reducción en el área total de la sección transversal para el crecimiento de los axones en los tubos para nervios multicanal. Las proporciones de área total del canal para los conductos de 1 canal frente a los conductos de 2, 4 y 7 canales son de 4,1, 2,1 y 1,9, respectivamente. Hallazgos similares se observaron también en un estudio anterior, aunque estos resultados estuvieron limitados por un gran hinchamiento y el colapso del biomaterial copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) en el estudio [de Ruiters y col., 2008b]. Los exámenes del CMAP ofrecen un índice importante para la función de conducción del nervio periférico. En este estudio, los inventores observaron que la mayor amplitud de CMAP de la reparación con autoinjerto tanto en los músculos plantares como en los músculos dorsales del pie. Esto es coherente con su mayor número de axones regenerados. Los grupos con conducto de un solo canal y con 4 canales mostraron similar diámetro de la fibra y grosor de la mielinización al grupo con autoinjerto. Se observaron fibras más inmaduras en los grupos con conductos de 2 y 7 canales y con el conducto NeuraGen® con menor diámetro de fibra y grosor de la mielinización, que están relacionados con los valores de amplitud inferiores en la prueba de CMAP. Los resultados cuantitativos de la regeneración en este estudio fueron aún mejores para la reparación con autoinjerto. Los grupos con autoinjerto mostraron mayor número de axones mielinizados, que es significativamente más alto que en todos los grupos en los que se implantaron conductos para nervios. En este trabajo, los inventores utilizaron el marcaje retrógrado doble para mostrar la exactitud de regeneración del axón motor a través del conducto de un solo canal y de los conductos para nervios multicanal. Los resultados de este estudio demuestran claramente la potencial influencia que tienen las estructuras de tubos para nervios multicanal en la limitación de la dispersión axonal a través del conducto sin disminuir los resultados cuantitativos de la regeneración. Después de la reparación con el conducto multicanal de colágeno, el porcentaje de neuronas motoras con proyecciones dobles hacia las ramas tibial y peroneal del nervio fue tres veces menor en comparación con la reparación con el conducto de colágeno de un solo canal (2,4 % frente a 7,1 %), mientras que el número total de neuronas motoras y axones regenerados fue igual. Esto sugirió que la reparación de nervios con conductos multicanal logra mejorar la exactitud de la regeneración de axones motores en comparación con la que se realiza a través del conducto de un solo canal, sin disminuir los resultados cuantitativos de la regeneración.

En este estudio, los inventores han mostrado por primera vez que los conductos para nervios con varios canales de diámetro inferior a un milímetro pueden fabricarse de manera reproducible a partir de colágeno purificado utilizando un nuevo proceso de varios pasos. Las condiciones de reticulación optimizadas por medio de EDC dieron como resultado estabilidad térmica y frente a la colagenasa y sin efectos sobre el crecimiento axonal robusto a partir de los DRG cultivados. Los inventores demostraron que los conductos multicanal tienen propiedades mecánicas superiores a los conductos de un solo canal creados usando técnicas de procesamiento similares, además de tener propiedades comparables a NeuraGen®, un conducto de un solo canal disponible comercialmente que contiene tres veces más colágeno por unidad de longitud. En comparación con los tubos de un solo canal, los conductos multicanal tienen el potencial de proporcionar reinervación superior a la diana al limitar la dispersión de los axones en regeneración y proporcionar orientación para el crecimiento del nervio. Tomados en conjunto, los resultados sugieren que los conductos de 4 y 7 canales de colágeno entrecruzado con EDC 30 mM de y NHS 10 mM poseen propiedades materiales y mecánicas favorables para aplicaciones de regeneración de nervios. Los términos y expresiones “comprende / que comprende” y “que tiene / que incluye”, cuando se usan en el presente documento con referencia a la presente invención, especifican la presencia de las características, los números enteros, las etapas o componentes expresados, pero no excluye la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

Se debe apreciar que ciertas características de la invención, que por claridad se describen en el contexto de formas de realización separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única forma de realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una única forma de realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

Referencias

1. Archibald, S.J., Krarup, C., Shefner, J. A Collagen-based Nerve Guide Conduit for Peripheral Nerve Repair: An Electrophysiological Study of Nerve Regeneration in Rodents and non-human Primates. *Journal of Comparative Neurology*. 1991; 306: 685-696.
- 55 2. Bellamkonda R.V. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels scaffolds and anisotropy. *Biomaterials* 2006; 27: 3515-3518.
3. Ben-Slimane, S., Guidoin, R., Marceau, D., Merhi, Y., King, M.W., Sigot-Luizard, M.F. Characteristics of polyester arterial grafts coated with albumin: The role and importance of the crosslinking chemicals. *J Eur Surg Res* 20, 18, 1988.

4. Bodine-Fowler SC, Meyer RS, Moskovitz A, Abrams R, Botte MJ: Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: A comparison of nerve repair techniques. *Muscle Nerve* 1997; 20: 29-37.
5. Brushart TM, Mathur V, Sood R, Koschorke GM: Joseph H. Boyes Award: Dispersion of regenerating axons across enclosed neural gaps. *J Hand Surg [Am]* 1995; 20: 557-564.
- 5 6. Cavalcanti RA, da Pureza DY, de Melo MP, de Souza RR, Bergamaschi CT, do Amaral SL, Tang H, Loesch A, Ribeiro AA. Low-intensity treadmill exercise-related changes in the rat stellate ganglion neurons. *J Neurosci Res*. 2009 May 1; 87(6): 1334
7. Chau, D.Y., Collighan, R.J., Verderio, E.A., Addy, V.L., Griffin, M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials* 26, 6518, 2005.
- 10 8. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol*. 2007; 204: 443-453.
9. Chen MH, Chen PR, Chen MH, Hsieh ST, Huang JS, Lin FH. An in vivo study of tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinking gelatin conduits in peripheral nerve repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006; 77: 89-97.
- 15 10. Chew, S.Y., Mi, R., Hoke, A., Leong, K.W. Aligned protein-polymer composite fibers enhance nerve regeneration: a potential tissue-engineering platform. *Adv Funct Mater* 17, 1288, 2007.
11. Collin, W., and Donoff, RB. Nerve Regeneration through Collagen Tubes. *Journal of Dental Research*. 1984: 63: 987-993.
- 20 12. de Ruiter GC, Spinner RJ, Alaid AO, Koch AJ, Wang H, Malessy MJ, Currier BL, Yaszemski MJ, Kaufman KR, Windebank AJ. Two-dimensional digital video ankle motion analysis for assessment of function in the rat sciatic nerve model. *J Peripher Nerv Syst*. 2007; 12: 216-222.
13. de Ruiter, G.C., Onyeneho, I.A., Liang, E.T., Moore, M.J., Knight, A.M., Malessy, M.J., Spinner, R.J., Lu, L., Currier, B.L., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J. Methods for in vitro characterization of multichannel nerve tubes. *J Biomed Mater Res A* 84, 643, 2008b.
- 25 14. de Ruiter GC, Spinner RJ, Malessy MJ, Moore MJ, Sorenson EJ, Currier BL, Yaszemski MJ, Windebank AJ. Accuracy of motor axon regeneration across autograft, single-lumen, and multichannel poly(lactic-co-glycolic acid) nerve tubes. *Neurosurgery*. 2008a; 63: 144-153; discussion 153-155.
15. Duan X, Sheardown H. Crosslinking of collagen with dendrimers. *J Biomed Mater Res A* 75, 510, 2005.
- 30 16. Dunn, M.W., Stenzel, K.H., Rubin, A.L., Miyata, T. Collagen implants in the vitreous. *Arch Ophthalmol* 82, 84, 1969.
17. English AW, Cucoranu D, Mulligan A, Sabatier M. Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. *J Comp Neurol*. 2009; 517: 245-255.
18. Evans GR, Brandt K, Katz S. Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2002; 23: 841-848.
- 35 19. Evans PJ, Bain JR, Mackinnon SE, Makino AP, Hunter DA: Selective reinnervation: A comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res* 1991; 559: 315-321.
20. Giannini, C., and Dyck, PJ. The Fate of Schwann Cell Basement Membranes in Permanently Transected Nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1990: 49: 550-563.
- 40 21. Iida H, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Wang Y, Low PA. Peripheral nerve ischemia: reperfusion injury and fiber regeneration. *Exp Neurol*. 2003; 184: 997-1002.
22. Jiang BG, Yin XF, Zhang DY, Fu ZG, Zhang HB. Maximum number of collaterals developed by one axon during peripheral nerve regeneration and the influence of that number on reinnervation effects. *Eur Neurol* 2007; 58: 12-20.
- 45 23. Jiao H, Yao J, Yang Y, Chen X, Lin W, Li Y, Gu X, Wang X. Chitosan/polyglycolic acid nerve grafts for axon regeneration from prolonged axotomized neurons to chronically denervated segments. *Biomaterials*. 2009; 30: 5004-5018.
24. Kim, Y.T., Haftel, K., Kumar, S., Bellamkonda, R.V. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 29, 3117, 2008.
25. Laquerriere, A., Jun, Y., Tiollier, J., Hemet, J., and Tadie, M. Experimental Evaluation of Bilayered Human Collagen as a Dural Substitute. *Journal of Neurosurgery*. 1993: 78: 487-491.

26. Matsuda, S., Iwata, H., Se, N., Ikada, Y. Bioadhesion of gelatin films cross-linked with glutaraldehyde. *J Biomed Mater Res* 45, 20, 1999.
27. Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Nakamura T, et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm defect bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res* 2000; 868: 315-328.
28. O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus*. 2009 Mar 23. [Epub ahead of print]
29. Ozay R, Bekar A, Kocaeli H, Karli N, Filiz G, Ulus IH. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surg Neurol*. 2007; 68: 615-622.
30. Pieper, J.S., Oosterhof, A., Dijkstra, P.J., Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20, 847, 1999.
31. Powell, H. M., Boyce, S. T. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials* 27, 5821, 2006.
32. Rodriguez, FJ, et al; (1999) Highly permeable polyactide-caprolactone nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps. *Biomaterials* 20(16); 489-500.
33. Sakakima H, Yoshida Y, Sakae K, Morimoto N. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand J Med Sci Sports*. 2004;14: 186-192.
34. Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, English AW. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol*. 2008;211: 489-493.
35. Sorenson, E.J., and Windebank, A.J. Relative Importance of Basement Membrane and Soluble Growth Factors in Delayed and Immediate Regeneration of Rat Sciatic Nerve. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1993; 52: 216-222.
36. Thomas F, Rivelino M, Hui SK, Molly SS. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* 2005;26: 4624-4632.
37. Ta, L.E., Espeset, L., Podratz, J., Windebank, A.J. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicol*. 27, 992, 2006.
38. Toba T, Nakamura T, Lynn AK, Matsumoto K, Fukuda S, Yoshitani M, et al. Evaluation of peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with laminin-soaked collagen sponge in dogs. *Int J Artif Organs* 2002; 25: 230-237.
39. van Wachem, P.B., van Luyn, M.J., Olde Damink, L.H., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Nieuwenhuis, P. Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen. *J Biomed Mater Res* 28, 353, 1994a.
40. van Wachem, P.B., van Luyn, M.J., Olde Damink, L.H., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Nieuwenhuis, P. Tissue regenerating capacity of carbodiimide-crosslinked dermal sheep collagen during repair of the abdominal wall. *Int J Artif. Organs* 17, 230, 1994b.
41. Vleggeert-Lankamp CL, de Ruyter GC, Wolfs JF, Pêgo AP, Feirabend HK, Lakke EA, Malessy MJ: Type grouping in skeletal muscles after experimental reinnervation: Another explanation. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 1249-1256.
42. Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain*. 2005;128: 1897-1910.
43. Wang W, Itoh S, Matsuda A, Aizawa T, Demura M, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J Enhanced nerve regeneration through a bilayered chitosan tube: the effect of introduction of glycine spacer into the CYIGSR sequence. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jun 15; 85: 919.
44. Wissink, M.J., van Luyn, M.J., Beernink, R., Dijk, F., Poot, A.A., Engbers, G.H., Beugeling, T., van Aken, W.G., Feijen, J. Endothelial cell seeding on crosslinked collagen: effects of crosslinking on endothelial cell proliferation and functional parameters. *Thromb Haemostasis* 84, 325, 2000.
45. Yang Y, Ding F, Wu J, Hu W, Liu W, Liu J, Gu X. *Biomaterials*. 2007; 28: 5526-5535. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration.
46. Yao, L., O'Brien, N., Windebank, A., Pandit, A. Orienting neurite growth in electrospun fibrous neural conduits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90, 483, 2009 (1).

47. Yao, L., Wang, S., Cui, W., Sherlock, R., O'Connell, C., Damodaran, G., Gorman, A., Windebank, A., Pandit, A. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomater* 5, 580, 2009 (2).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un conducto para nervios multicanal de colágeno que comprende:
 - (a) colocar al menos una matriz alargada entre dos retenedores de un molde de conducto para nervios multicanal, de tal manera que las matrices se mantengan en una relación separada entre sí,
 - 5 (b) verter la disolución de colágeno sobre cada matriz para que toda la matriz quede sustancialmente recubierta,
 - (c) secar la disolución de colágeno en las matrices,
 - (d) repetir las etapas (a) a (c) con más matrices hasta que se hayan usado tantas matrices como el número de canales deseados en el conducto,
 - (e) reticular el colágeno seco en las matrices, y
 - 10 (f) lavar el colágeno reticulado en las matrices para retirar la disolución de reticulación residual.
2. Un procedimiento de fabricación de un conducto para nervios multicanal de colágeno que comprende:
 - (a) fijar al menos una matriz alargada entre dos retenedores separados,
 - (b) verter la disolución de colágeno sobre la matriz para que toda la matriz quede sustancialmente recubierta,
 - (c) dejar secar la disolución de colágeno en la matriz,
 - 15 (d) reticular el colágeno seco en la matriz,
 - (e) lavar el colágeno reticulado en la matriz para eliminar el agente de reticulación.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2 en el que se vierte más disolución de colágeno alrededor de la construcción de colágeno seca en la matriz y/o vertida alrededor del retenedor.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de colágeno es de entre 3 y 15 mg/ml, de preferencia 12 mg/ml.
- 20 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de reticulación está seleccionado del grupo que consiste en EDC, transglutaminasa, glutaraldehído, genepin, sulfonatos, incluidos el sulfonato de metilo y sulfonato de trifluorometilo, maleimida, sistemas dendriméricos de polietilenglicol tales como 4S-StarPEG, polímeros dendríticos, polímeros dendríticos hiper-ramificados, formaldehído, agentes de reticulación enzimáticos, glicación, gliceraldehídos, cianamida, diimida, diisocianato, adipimidato de dimetilo, carbodiimida y epoxi.
- 25 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que el colágeno secado al aire es reticulado con una disolución de EDC 1-60 mM y NHS 1-30 mM en disolución de MES 1-100 mM, de preferencia EDC 30 mM y NHS 10 mM en disolución de MES 50 mM.
- 30 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de lavado se lleva a cabo con NaH_2PO_4 0,1-0,2 M y agua destilada.
8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que después del lavado, el colágeno es liofilizado sobre la matriz.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conducto para nervios de colágeno es retirado de la matriz.
- 35 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz es un alambre de metal.
11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se utilizan de dos a doscientos, de preferencia dos, cuatro o siete matrices entre los retenedores.
- 40 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las matrices son de tamaño uniforme y están separadas de manera uniforme.
13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el colágeno es colágeno tipo I, de preferencia colágeno de tendón de bovino.

14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende la inmovilización de biomoléculas al colágeno, de preferencia seleccionadas del grupo que comprende ácidos nucleicos tales como ADN de plásmido o siARN, péptidos, laminina o factores de crecimiento nervioso tales como NGF o NT3.

15. Un conducto para nervios multicanal de colágeno reticulado cuando esté producido por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5

Figura 1.

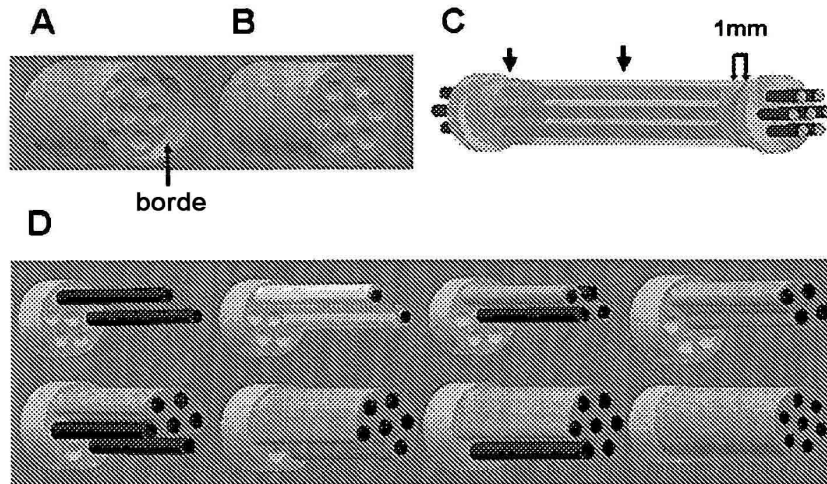


Figura 2.

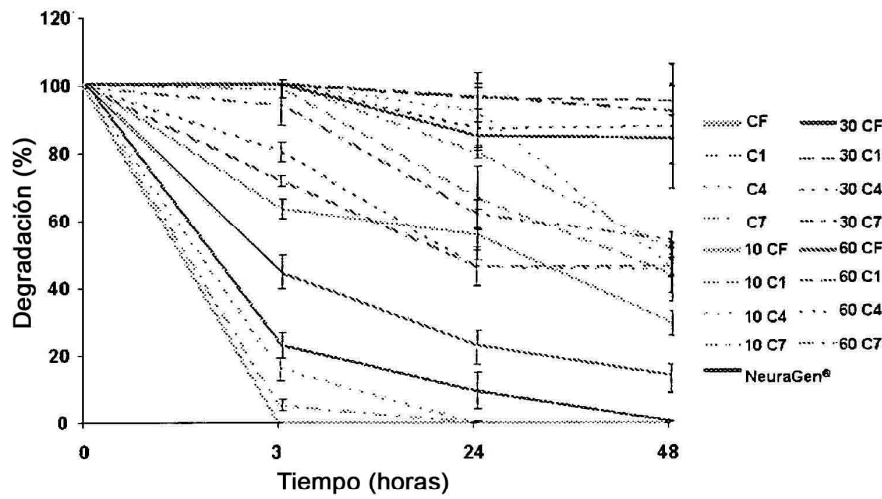


Figura 3.

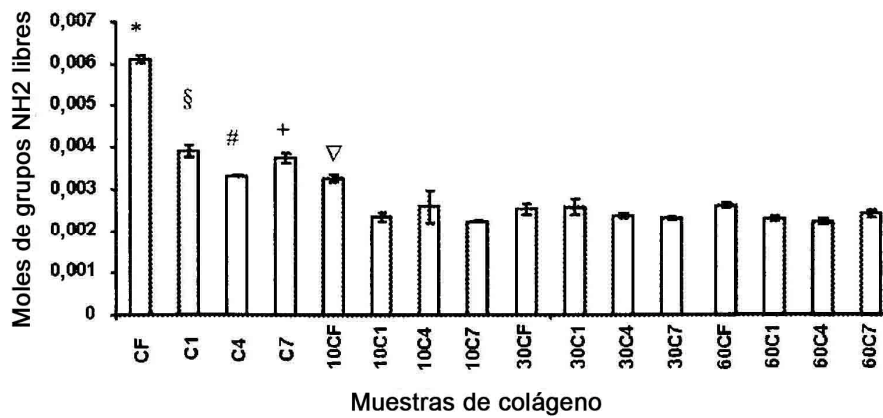


Figura 4.

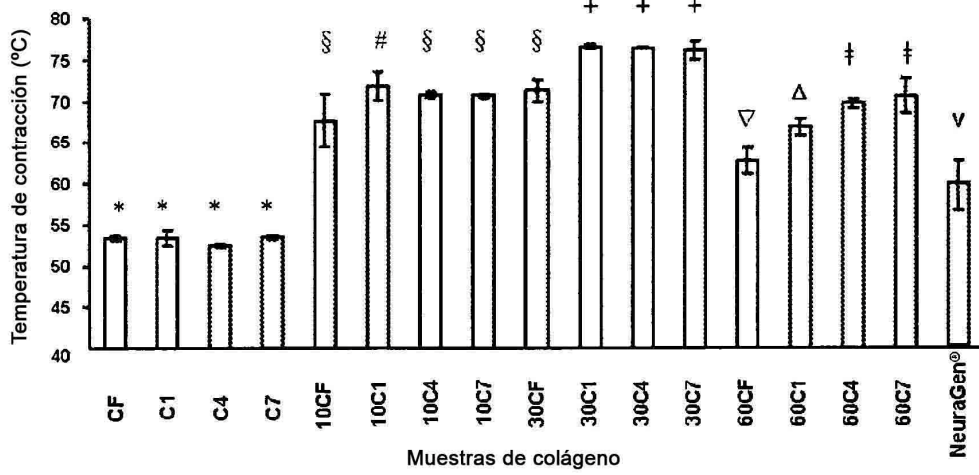


Figura 5.

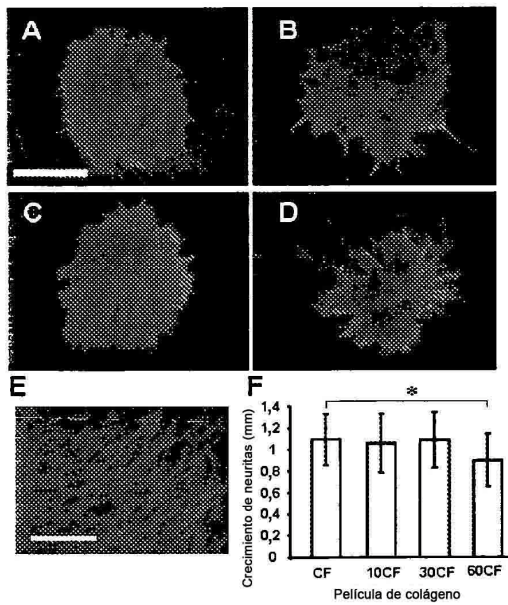


Figura 6.

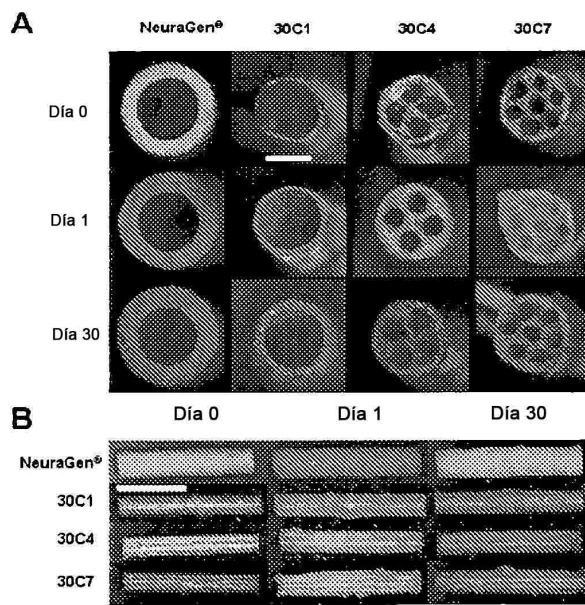


Figura 7.

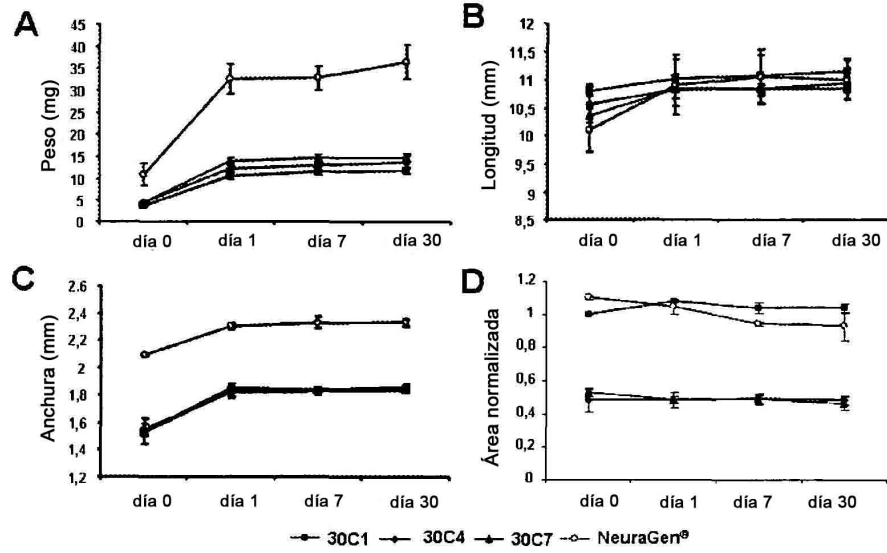


Figura 8.

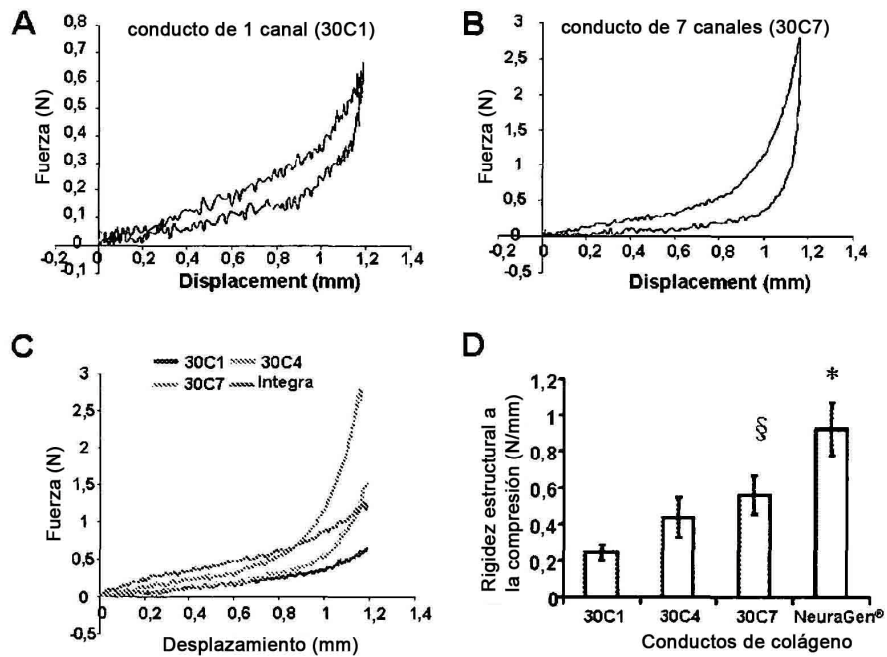


Figura 9.

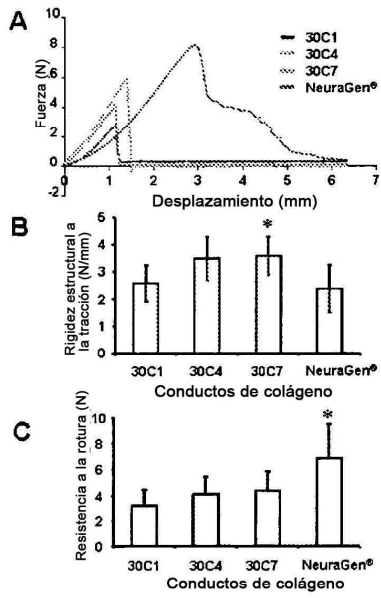


Figura 10.

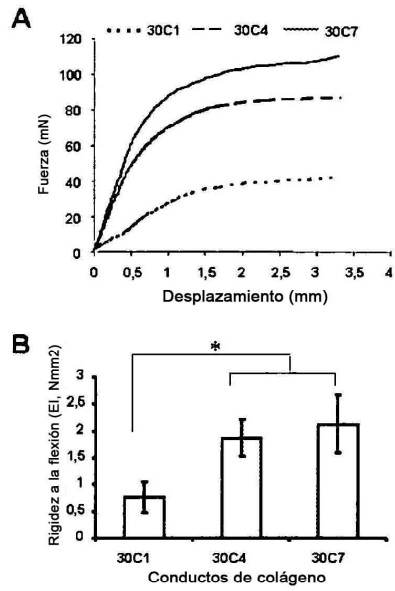


Figura 11.

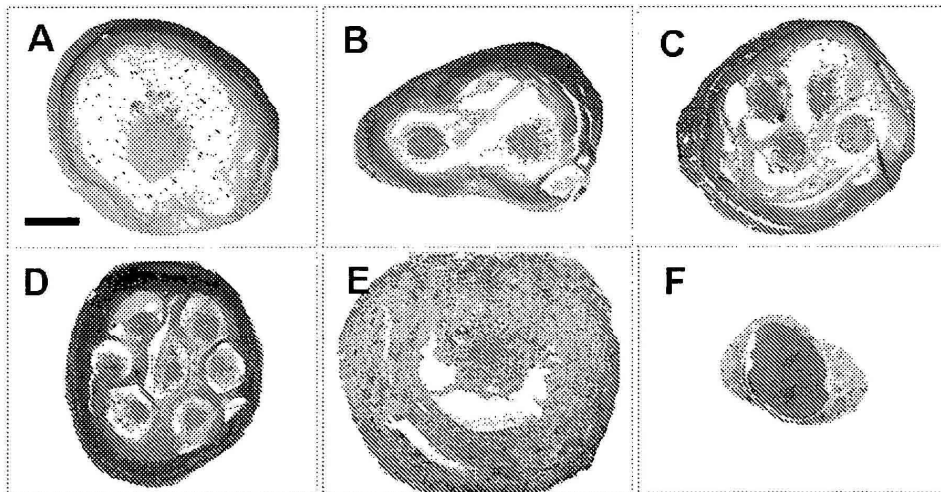


Figura 12.

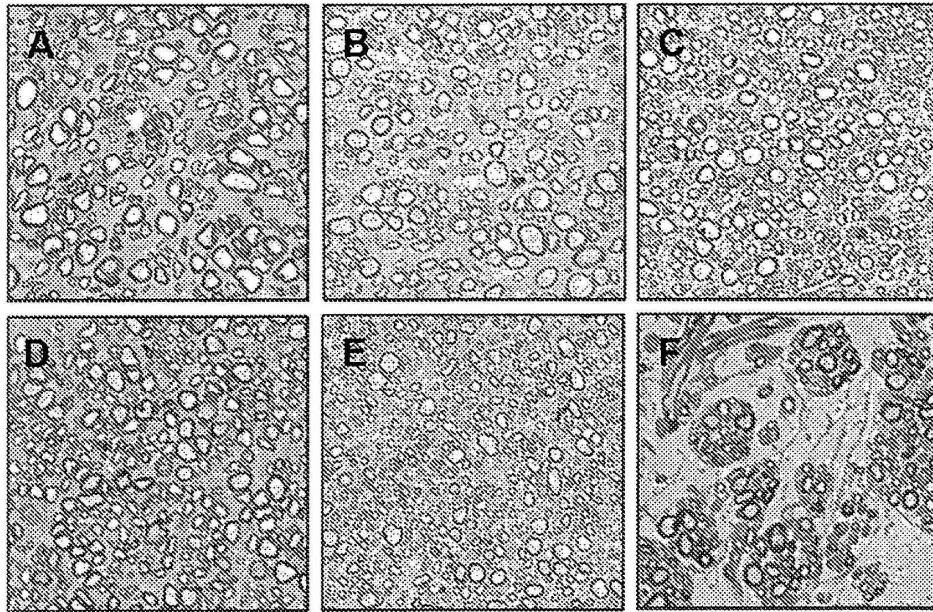


Figura 13.

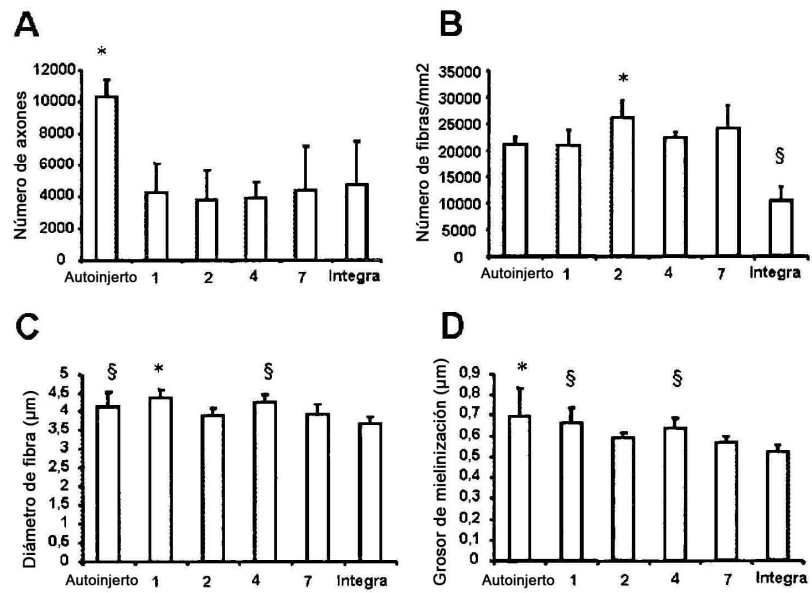


Figura 14.

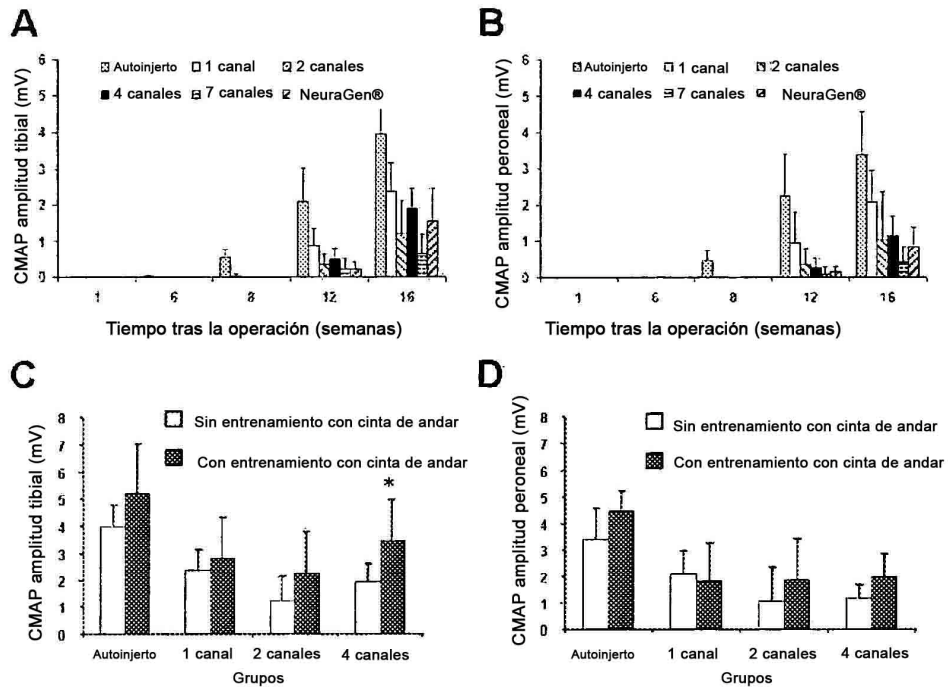
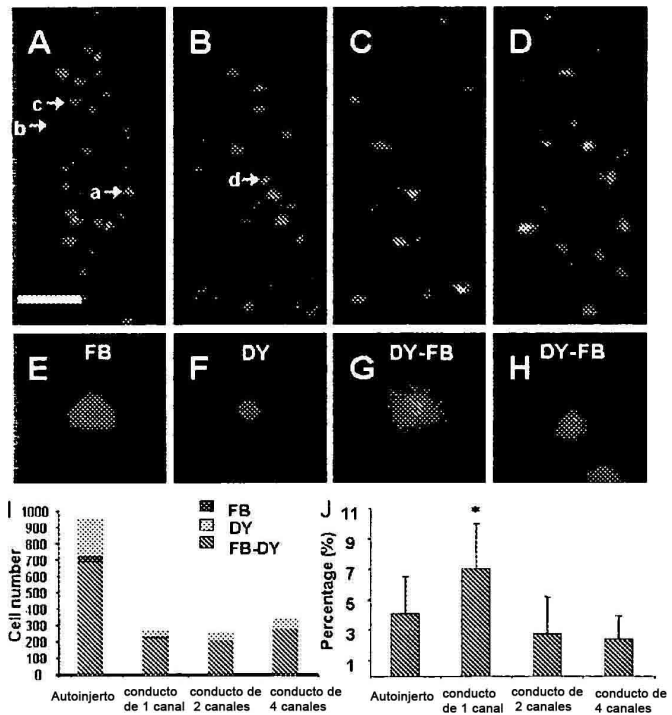


Figura 15.



Ispc2696