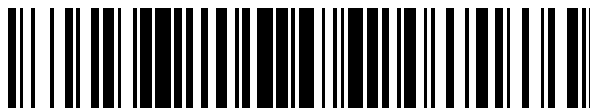


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 883**

21 Número de solicitud: 201431855

51 Int. Cl.:

A61F 2/02

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.12.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.07.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070909

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(62.5%)**

**CTT - Centro de Transferencia de Tecnología
Edif. Nexus, 3º, Camino de Vera s/n
46022 Valencia ES y**

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN
CARLOS (37.5%)**

72 Inventor/es:

MONLEÓN PRADAS, Manuel;

VALLÉS LLUCH, Ana;

MARTÍNEZ RAMOS, Cristina;

VILARIÑO FELTRER, Guillermo;

BARCIA ALBACAR, Juan Antonio y

GÓMEZ PINEDO, Ulises

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **Biohíbrido para su uso en la regeneración de tractos neurales**

57 Resumen:

Biohíbrido para su uso en la regeneración de tractos neurales.

La presente invención describe un biohíbrido para su uso en la regeneración de tractos neurales, que comprende un andamiaje híbrido tubular implantable degradable y biocompatible caracterizado porque comprende tres capas de porosidad diferente: una capa interna a), una capa intermedia b) y una capa externa c), con continuidad entre ellas, y compuestas las tres por un mismo hidrogel poroso basado en ácido hialurónico reticulado, a un biohíbrido que comprende el andamiaje tubular híbrido descrito que puede contener en el interior del mismo un material fibroso, preferentemente ácido poli-L-láctico, a un procedimiento para obtener dicho andamiaje tubular híbrido y dicho biohíbrido, y al uso de ellos para regenerar tractos neurales en enfermedades que afectan al sistema nervioso central, preferentemente la enfermedad de Parkinson.

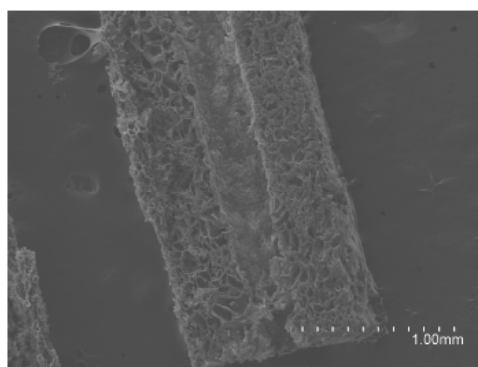


Fig. 5

ES 2 577 883 A1

DESCRIPCIÓN

Biohíbrido para su uso en la regeneración de tractos neurales**Campo de la Invención**

- 5 La presente invención se refiere a un biohíbrido para su uso en la regeneración de tractos neurales, que comprende un andamiaje híbrido tubular para su uso en la regeneración de dichos tractos, así como a dicho andamiaje tubular.

Antecedentes de la Invención

- 10 Diversas enfermedades que afectan al sistema nervioso central, como la enfermedad de Parkinson, se tratan actualmente con fármacos que alivian la sintomatología y frenan la degeneración. Sin embargo, no existe para muchas de ellas un tratamiento que constituya una terapia real y efectiva.

Una solución, todavía en ensayo clínico, consiste en que las células son injertadas *in situ*; sin embargo, se produce una baja supervivencia y baja efectividad.

- 15 En el sistema nervioso periférico existen otras soluciones similares a las de un conducto para la regeneración nerviosa.

El uso de ácido hialurónico (HA) en la formación de tubos porosos que incorporan otros polímeros como ácido poli-L-láctico (PLLA) y donde se desarrollan células de Schwann y se incorporan diversos factores de crecimiento, factores neurotróficos, etc. es conocido en el estado de la técnica.

- 20 El artículo "New artificial nerve conduits made with photocrosslinked hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration" Sakai Y1, Matsuyama Y, Takahashi K, Sato T, Hattori T, Nakashima S, Ishiguro N. *Biomed Mater Eng.* 2007;17(3):191-7, describe estructuras porosas tubulares a base de HA fotoreticulado con diámetro de 1,2 mm y poros de 50 µm sobre las que crecen células de Schwann. Sin embargo, la estructura tubular porosa descrita en este documento se diferencia de la presente invención en que no consta de tres capas. Además, la composición del reactivo utilizado en el artículo es una modificación de ácido hialurónico con ácido cinámico, y difiere de la de la presente invención, que es ácido hialurónico sin modificar, el cual posteriormente se entrecruza por reacción, por ejemplo, con divinil sulfona para formar un hilano. Esta diferencia en la composición afecta al comportamiento fisicoquímico, a la velocidad de degradación y a la respuesta biológica del material sintetizado, por lo que dicho conducto y el de la presente invención no son comparables.

- Otro artículo titulado "*Electrospun adherent-antiadherent bilayered membranes based on cross-linked hyaluronic for advanced tissue engineering applications*" Arnal-Pastor M, Martínez Ramos C., , Pérez Garnés M, Monleón Pradas M, Vallés Lluch A. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013 Oct;33(7):4086-93, se refiere a una estructura bicapa en la que una de las capas es de HA y la otra es de ácido poliláctico. Sin embargo, no se trata de estructuras tubulares y no se hace mención a la porosidad de las mismas.

- La solicitud de patente WO2006077085 describe un biomaterial derivado de HA auto-reticulado y células madre neuronales para la regeneración de daños en el sistema nervioso periférico y medula espinal. Según la reivindicación 5 de este documento, el biomaterial puede estar en forma de tubos con paredes porosas. Sin embargo, no se trata, en el caso de WO2006077085, de una estructura de tres capas con distinta porosidad en cada una de ellas. Este biomaterial se obtiene a) tratando el derivado de HA con una solución de recubrimiento, promoviendo la adhesión de células madre neurales, crecimiento de neuritas y diferenciación; b) poniendo en contacto células madre neurales aisladas con el derivado de HA de la etapa anterior, y c) cultivando y expandiendo las células adheridas en presencia de factores de crecimiento neurotróficos seleccionados entre beta-FGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), CNTF (factor neurotrófico ciliar), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y GDNF (factor neurotrófico derivado de glías) o mezclas de ellos.

- La solicitud de patente US2003060871 se refiere a un estructura tubular bioestable y bioabsorbible que puede tener hasta tres capas, siendo siempre una de ellas PTFE expandido, pero pudiendo ser las otras dos ácido poliláctico y HA. Se trata de un stent para la liberación de fármacos. Las distintas capas pueden tener distintos diámetro de poro. No se dice que el HA esté sin embargo reticulado. Por lo tanto también tiene diferencias esenciales con el andamiaje tubular de la presente invención.

No existe en la actualidad un producto que permita trasplantar y conducir de manera protegida células neurales en el cerebro con el objetivo de regenerar el tracto nigroestriatal en enfermedades del sistema nervioso central y, especialmente, la enfermedad de Parkinson. Este problema se puede abordar con el andamiaje tubular biodegradable y biocompatible que proporciona la presente invención.

5 La estrategia basada en el conducto de la presente invención supera los inconvenientes del estado de la técnica, de modo que permitirá repoblar la sustancia negra con células dopaminérgicas y proteger y guiar el proceso de extensión axonal hasta alcanzar la reconexión con el cuerpo estriado regenerando así el tracto nigroestriatal.

10 La solución que propone la presente invención podría usarse también para regeneración nerviosa en el sistema nervioso periférico.

La solución aportada por la presente invención presenta las siguientes propiedades ventajosas:

a) Las paredes del conducto admiten el flujo libre de moléculas necesarias para el desarrollo y la supervivencia de las células.

15 b) Protege las células transplantadas en el lugar que se pretende regenerar y evita que las células agresivas accedan a su interior.

c) Es biodegradable y desaparece por completo del organismo sin necesidad de realizar nuevas intervenciones quirúrgicas. La velocidad con la que desaparece es, además, ampliamente modulable con pequeñas variaciones en algunos parámetros durante la síntesis.

20 d) Limita o inhibe el efecto de la reacción a cuerpo extraño inherente al injerto de cualquier dispositivo en el organismo.

e) Puede servir de portador de fármacos para que estos se liberen gradualmente en la zona dañada.

Descripción de la invención

25 A lo largo de la presente memoria los términos que aparecen a continuación tienen el siguiente significado:

- "andamiaje tubular híbrido", "andamiaje tubular", "conducto tubular híbrido" y "conducto tubular" se usan indistintamente.

30 La presente invención se refiere a un andamiaje tubular o conducto tubular híbrido de ácido hialurónico al cual se le introducen fibras de ácido poli-L-láctico (PLLA) en el lumen, y se puede sembrar con células de interés, tales como células de Schwann o células gliales en general y/o neuronas o precursores neurales *in vitro*, de modo que se pueda evaluar el rendimiento del mismo.

35 La estructura tubular del conducto debe ser capaz de aislar y proteger las células sembradas en su lumen del microambiente circundante hostil externo, gracias a su morfología microporosa, la cual permite el intercambio de oxígeno y nutrientes y la eliminación de productos de desecho. Simultáneamente a esta tarea de intercambio, la estructura microporosa actúa como una barrera para moléculas grandes o células.

40 La presente invención se refiere por tanto a un andamiaje tubular implantable degradable y biocompatible caracterizado por que comprende tres capas de porosidad diferente: una capa interna a), una capa intermedia b) y una capa externa c), con continuidad entre ellas, y compuestas las tres por un mismo hidrogel poroso basado en ácido hialurónico reticulado.

Según realizaciones particulares, del andamiaje tubular:

- la capa interna a) tiene microporos inferiores a aproximadamente 1 μm , preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 0,4 μm y más preferentemente de aproximadamente 0,2 μm ,

45 - la capa intermedia b) tiene poros interconectados de mayor tamaño que los de las capas interna y externa, en forma de panal, de tamaño entre aproximadamente 10 y 70 μm , preferentemente entre aproximadamente 20 y 50 μm , y

- la capa externa, c) tiene poros irregulares de tamaño inferior a aproximadamente 12 μm , preferentemente entre aproximadamente 1 y 12, más preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 μm

El conducto híbrido o andamiaje tubular híbrido de la invención puede tener una longitud de hasta 5 cm, según se requiera para la aplicación particular. Este conducto o andamiaje tubular híbrido presenta un canal interior centrado, o lumen, de diámetro entre 1 y 0,20 mm. El canal central debe ser suficientemente ancho en condiciones de humedad para permitir la inserción de fibras de PLLA en su interior.

5 La presente invención se refiere también a un biohíbrido, definido como un conjunto que comprende un andamiaje tubular como el anteriormente definido, más el producto que contenga en su interior, que pueden ser por ejemplo, células, puede ser una neurotrofina etc, o cualquier combinación. Dicho biohíbrido puede alojar células de Schwann o glía envolvente olfatoria en su interior o en general células gliales y neurales.

10 Según realizaciones particulares, el biohíbrido además comprende factores de crecimiento y/o fármacos en su lumen. Los factores de crecimiento son por ejemplo, las neurotrofinas NGF, BDNF o GDNF. Los fármacos son, por ejemplo, dopaminérgicos, como la L-dopa.

De manera preferida los factores de crecimiento y/o los fármacos se encuentran en el lumen embebidos en geles o micropartículas. Los geles podrían ser, por ejemplo, péptidos inyectables y gelificables in situ o disoluciones de hidrogeles como fibrina, colágeno o agarosa. Las micropartículas pueden tener carácter hidrófilo como la gelatina o hidrófobo como el PLLA, o gelatina entrecruzada, en función del carácter de la molécula a cargar en ellas, y tamaños variables hasta el orden de decenas de micras.

15 Según realizaciones particulares, el biohíbrido comprende microfilamentos de poliésteres sintéticos degradables (ácido poli-L-láctico, ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona o copolímeros de éstos, por ejemplo), de nylon o de seda de hasta decenas de micras, dispuestos en paralelo en el lumen, que sirven de soporte para la adhesión y guía a la migración de células y la extensión de axones.

Además, la presente invención se refiere también a un procedimiento para obtener el andamiaje tubular definido caracterizado por que comprende al menos:

- disponer un molde para contener dicho andamiaje tubular,
- 25 - introducir en dicho molde un material polimérico en forma de fibra(s),
- preparar disoluciones de HA y agitarlas en presencia de un agente de entrecruzamiento,
- inyectar dichas disoluciones en las ranuras del molde, obteniendo un conjunto molde-soluciones que reticula in situ,
- congelar el conjunto obtenido molde-soluciones, y
- 30 - liofilizar el conjunto molde-soluciones obteniendo matrices microporosas de HA.

Según realizaciones particulares el molde es de material polimérico hidrófobo, el material polimérico en forma de fibras es material polimérico hidrófobo y el agente de entrecruzamiento es divinil sulfona, glutaraldehído o carbodiimida.

35 Según una realización adicional concreta del procedimiento el molde es de politetrafluoroetileno, el material polimérico en forma de fibra es de poli-ε-caprolactona y el agente de entrecruzamiento es divinil sulfona, glutaraldehído o carbodiimida.

El molde utilizado tiene ranuras que pueden ser de dimensiones y formas diversas. Por ejemplo, pueden ser ranuras de sección cuadrada, circular, ovalada, irregular, o cualquier otra forma poligonal. Las ranuras pueden tener un ancho de hasta 3 mm.

40 El material en forma de fibras, preferentemente poli-ε-caprolactona, utilizado tiene un diámetro aproximado de entre 200 y 1000 μm; y una longitud mayor que el conducto tubular.

Cuando se usa divinil sulfona (DVS) como agente de entrecruzamiento se puede utilizar una relación molar DVS:unidades monoméricas de HA de 0,5:1 o mayor.

45 Las disoluciones de HA pueden ser disoluciones con distintas concentraciones entre el 0,5 % y 8 % en peso siempre referido a peso de HA en hidróxido sódico 0,2 M. De modo preferente las disoluciones de HA tienen concentraciones de entre 1 y 5% en peso de HA en hidróxido sódico 0,2 M.

Las disoluciones de HA se agitan y se congelan hasta -20°C durante un mínimo de 5 h. La liofilización del conjunto de molde-disolución, durante 24 h, se realiza a una presión inferior a 600 Pa y una temperatura inicial de unos -80°C. Como producto de la liofilización se obtienen matrices microporosas de HA debido a la sublimación de agua.

Después de la etapa de liofilización, se retira el andamiaje tubular del molde y los anillos del material que constituye el propio molde, se retiran las fibras del polímero en forma de fibras, obteniendo un conducto con un canal interior centrado, y se hidratan los conductos de HA obtenidos. Después de la etapa de hidratación se pueden insertar fibras de PLLA en su interior.

- 5 La presente invención se refiere también a un andamiaje tubular tal como se ha definido que se obtiene mediante el procedimiento descrito anteriormente.

La presente invención se refiere también al uso del andamiaje tubular definido o del biohíbrido que comprende dicho andamiaje, para inducir la regeneración de tractos neurales y la reconexión de poblaciones neuronales dañadas o degeneradas.

- 10 La presente invención se refiere también al uso del andamiaje tubular definido o del biohíbrido que comprende dicho andamiaje para su uso en la regeneración del tracto nigroestriatal en enfermedades que afectan al sistema nervioso central, preferentemente la enfermedad de Parkinson y lesiones medulares.

- Se han desarrollado conductos HA milimétricos con una porosidad tan singular de la pared, dependiente de la profundidad, que permite la difusión de nutrientes o señales moleculares, a la vez que impide que las células penetren en ellos. Las diferentes etapas del procedimiento de fabricación de los materiales les proporciona una estabilidad dimensional y estructural y restringe sensiblemente su hinchamiento en el medio fisiológico. Los conductos tubulares tienen un lumen en el que las células de interés pueden ser sembradas en un ambiente protegido. Se puede incluir previamente un haz de fibras a lo largo del lumen, como se ha descrito de poliésteres sintéticos, nylon o seda, por ejemplo de PLLA, para facilitar la migración o crecimiento celular. Estos conductos han demostrado ser compatibles con células de Schwann (SCs), como se ha demostrado en cultivos *in vitro*. El hidrogel tridimensional especialmente diseñado a medida representa un ambiente favorable para las células en cuanto a su viabilidad, migración y distribución, puesto que ellas proliferan en el mismo orden en el que lo hacen sobre otros sustratos más apropiados para las células, como el PLLA. A pesar de la característica típica de baja adherencia del HA que habitualmente impide una buena proliferación celular, las células SCs pueden cubrir el lumen de un extremo a otro, de conductos de varios milímetros, formando una capa continua basada en uniones célula-célula. Además las células gliales cultivadas dentro de los conductos producen cantidades importantes de proteínas de mielina estructural a lo largo del tiempo, incluso en ausencia de axones. Por todas estas razones, los nuevos conductos de HA porosos son una estrategia prometedora para el restablecimiento de los tractos neuronales dañados.

- 30 El conducto que se ha desarrollado es un puente de potencial superior para la regeneración de tractos nerviosos por varias razones:

- En primer lugar, una característica especial del conducto es la pared porosa de triple capa, que da como resultado una distribución de poro más controlada que otros dispositivos comparables. Las superficies singulares de la pared del conducto son capaces de evitar la migración de células injertadas fuera del canal, formando una barrera para los astrocitos, macrófagos y otras células huésped para evitar que interactúen físicamente con el interior.

- A pesar de ello, las dimensiones de microporosidad permiten el flujo de diferentes moléculas como nutrientes, productos de desecho, gases diluidos y citoquinas y otras señales moleculares implicadas en la comunicación celular y la regulación. Así, los compartimentos de la pared permiten el intercambio de nutrientes y residuos celulares y evitan el contacto entre las células injertadas y las células huésped. Según se produce la degradación y la estructura porosa interna de poros de gran tamaño es expuesta, el sustrato de la pared conviene que mimetice el tejido circundante en cuanto a la forma de los poros y el tamaño, similar a los del tejido cerebral.

- 45 En segundo lugar, el sustrato del conducto está constituido por cadenas de ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular, con una respuesta inmune baja al huésped, que debería ser ideal para fines de injertos, a la vez que es biodegradable y biocompatible. Además, aunque el ácido hialurónico entrecruzado es un gel altamente higroscópico, el proceso de liofilización limita la variación dimensional debida al hinchamiento en soluciones acuosas. Este es un factor clave que hay que tener en cuenta para considerar su implantación quirúrgica, puesto que los nervios y los tejidos blandos en el sistema nervioso central - SNC - son muy sensibles a la compresión y podrían de otro modo cambiar la respuesta regeneradora del medio ambiente circundante. El coeficiente de difusión, sin embargo, fue del orden del de las pequeñas moléculas de gas difundiendo a través de una membrana sólida.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la distribución de tamaños de poro (μm) y porosidad (fracción del volumen total que son poros, %) de las diferentes capas del andamiaje tubular.

La Figura 2 muestra la difusión de glucosa a través del conducto híbrido (molécula pequeña)

- 5 La Figura 3 muestra la difusión de albúmina de suero bovino (BSA, molécula más grande) a través del conducto tubular.

- La Figura 4 muestra mediante una imagen de microscopía confocal, los resultados de difusión a través de células de Schwann cultivadas 10 días en el interior del conducto, cuyo citoesqueleto aparece marcado por falacidina en color gris La línea de trazos muestra los límites del canal: las células no pueden traspasar éste.

La Figura 5 es una imagen de microscopía electrónica de barrido del mismo cultivo de células de Schwann que en la Figura 4, mostrando el canal con las células adheridas, y la estructura de la sección longitudinal del tubo. No se detectan células ni en el exterior ni en la capa intermedia del conducto.

Ejemplos

15 1. Preparación de materiales

- Se utilizó como molde para los conductos un bloque delgado de politetrafluoroetileno (PTFE) con ranuras perforadas de 1,5 mm de ancho. En cada ranura se dispuso una fibra de poli- ϵ -caprolactona (PCL, PolySciences) de 400-450 μm de diámetro usando arandelas de PTFE con diámetro externo de 1,5 mm cada 3 cm de fibra para mantenerla centrada. Estas fibras actuaron como un negativo para el lumen de los conductos. Se prepararon soluciones de HA (Sigma-Aldrich) al 1, 3 y 5% en peso de HA en una disolución de hidróxido sódico (NaOH, Scharlab) y se agitaron suavemente. Se usó divinil sulfona como agente de entrecruzamiento (DVS, Sigma-Aldrich) (mediante una adición 1,4 de Michael) en una relación molar DVS:HA de unidades de monómero de 9:10. Después de la adición, las soluciones se agitaron durante 10 segundos más y se inyectaron en las ranuras del molde. Una vez gelificada la solución, el molde se colocó en una placa Petri para evitar evaporación y se enfrió hasta -20°C . Después, el conjunto de molde-disolución fue liofilizado (Lyoquest-85, Telstar) durante 24 h a 20 Pa y -80°C para generar matrices microporosas HA debido a la sublimación de agua. A continuación el conducto de fibras fue retirado cuidadosamente del molde y los anillos de PTFE fueron eliminados. Para extraer la fibra de PCL de cada uno de los conductos de HA, dicha fibra fue estirada desde sus extremos para reducir su diámetro. Finalmente los conductos fueron cortados en porciones de 6 mm y almacenados a $4-8^{\circ}\text{C}$ en agua destilada estéril hasta su uso (hasta 4 semanas).

- Se obtuvieron conductos de HA después de la liofilización de disoluciones de HA al 1, 3 y 5% en peso de HA inyectadas en los moldes junto con el agente de entrecruzamiento. El resultado fue un conducto blando, estable, con dimensiones de $5,384 \pm 0,246$ mm de longitud y $1,251 \pm 0,117$ mm de ancho. Este conducto presentaba un canal interior centrado de $0,406 \pm 0,056$ mm de diámetro. El canal central fue suficientemente ancho en condiciones de humedad para permitir la inserción de fibras de PLLA en su interior.

- El canal central se extiende desde un extremo a otro del andamiaje. En el caso de HA-PLLA las fibras blandas se disponen paralelas a la superficie del canal para favorecer la extensión de las células sobre ellas.

- Un estudio estructural mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la porosidad en diferentes zonas de la pared de los conductos de HA al 5 % en peso, reveló un sustrato permeable singular, en el cual se observaron tres topologías de poro. La superficie del canal presentó una capa continua y homogénea con microporos; la estructura interna mostró poros más grandes interconectados de tipo nido de abeja y la superficie externa fue áspera con una distribución de cavidades al azar.

2. Células y conducto híbrido

- Se usaron cultivos primarios de células de ratas Schwann (SCs, Innoprot). Se cultivaron SCs en frascos y se crecieron para confluir a 37°C , 5% CO_2 , en un medio completo que contenía amino ácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, compuestos orgánicos e inorgánicos, hormonas, factores de crecimiento, trazas de minerales y 10% de suero fetal bovino (P60123, Innoprot). Todos los experimentos se realizaron con células en pase 4 a 6. Se desinfectaron conductos de HA al 5%, con su lumen hueco u ocupado por fibras

de PLLA, y sus películas fueron desinfectadas y pre-acondicionadas para experimentos de cultivos celulares en un recinto de flujo laminar, mediante dos aclarados sucesivos con etanol de 70° durante 1 hora. Se aclararon las muestras con etanol de 50° y 30° durante 10 minutos cada vez, y a continuación se aclararon rigurosamente con agua desionizada. Se evaluó la viabilidad y proliferación de las SCs mediante el ensayo MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega). En conductos de HA y conductos de HA con fibras de PLLA en su lumen se produjo un aumento significativo de la absorbancia con el tiempo de cultivo, con respecto a los materiales bidimensionales. Los resultados obtenidos en ambas estructuras tridimensionales fueron del mismo orden para cada cultivo y similares a aquéllos encontrados para las películas de PLLA en el día número 10. Células viables y muertas fueron teñidas y fotografiadas por microscopía de fluorescencia; las imágenes después de 5 y 10 días de cultivo muestran una cantidad considerable de células vivas teñidas con calceína para las tres estructuras: conductos de HA, conductos de HA-PLLA y haces de PLLA. La mortalidad celular fue mayor sobre fibras de PLLA que dentro de los conductos de HA, con o sin tales fibras. Cuantitativamente, el análisis de citometría de flujo reveló una disminución en el porcentaje de células muertas dentro de los conductos con el tiempo de cultivo (LIVE/DEAD Cell Viability Assay, Life Technologies), mientras que no se produce esta disminución de células muertas cuando las células se cultivaron con el control (fondo de pocillo de placa de cultivo). El estudio de la distribución celular dentro de los conductos, mediante inmunohistoquímica y procesamiento de imágenes reveló una población de células uniforme después de 10 días de cultivo a lo largo de un extremo a otro del lumen, independientemente de que estuviese relleno o no con fibras. En aquellos conductos que contienen fibras de PLLA, las células parecían estar mejor distribuidas a lo largo de la sección del lumen, mientras que las células se mostraban más bien enrolladas como una hoja en el lumen vacío; este hecho se refleja como la desviación de la intensidad media a lo largo de los conductos, la cual es mayor en el primer caso. Por último, la identidad de las células se confirmó como SCa mediante tinción de anticuerpos anti-GFAP, anti-p75 y anti-S100 y su morfología fue revelada por falacina en conductos con o sin fibras. En conductos de HA las SCs consiguieron un alto grado de confluencia después de 10 días de cultivo y tenían procesos celulares, con frecuencia ramificados. Las células se extendieron y proliferaron como una capa y migraron a lo largo del lumen. Sin embargo sobre las fibras de PLLA las células SCs se alinearon respecto al eje largo de las fibras y mostraron una morfología bipolar, con una forma principalmente de husillo y establecieron contactos célula-célula. En imágenes multifotón se pudo observar sin necesidad de ningún corte que las células se acomodaron recubriendo el lumen de los conductos de HA y HA-PLLA. Resultados similares se pudieron confirmar por imágenes de microscopía electrónica de barrido (*scan electron microscopy* – SEM), en las que los detalles permiten valorar el grado distinto de adhesión de las células dependiendo del sustrato: las células mostraron una conformación redonda formando agregados y estableciendo adhesiones localizadas sobre la superficie del lumen de HA, pero elongadas y completamente adheridas sobre las fibras revelando un contacto íntimo células-PLLA. La expresión de la glicoproteína mielina (p0) después de 10 días de cultivo aumentó en comparación con 1 día en conductos de HA y HA-PLLA. La expresión de la proteína mielina cero (p0), que codifica la principal proteína mielina (constituyendo más del 50% de la proteína total en células Schwann maduras) y que interviene en la adhesión de membranas en envolturas espirales de vainas de mielina, en procesos de compactación, de manera interesante aumentó en un ambiente 3D sin adición de ninguna señal axonal. Esta expresión p0 es apenas detectable después de 1 día, pero su presencia es masiva en los conductos después de 10 días, tanto con fibras como sin fibras.

Las Figuras 2 y 3 muestran que tanto moléculas pequeñas de interés fisiológico, como la glucosa, como proteínas (como BSA), pueden difundir con facilidad a través de las paredes del tubo. En las Figuras 4 y 5 se muestra la efectividad del confinamiento del canal en células que fueron sembradas en su interior. Ello demuestra, al mismo tiempo, que células del exterior no pueden penetrar en el canal. Esta propiedad protege a las células situadas en el interior del tubo de posibles agresiones del entorno.

Como prueba de que la membrana tricapa no supone un obstáculo al paso de nutrientes y moléculas bioactivas, pero impide la migración de las células del interior hacia afuera, o la penetración desde fuera, se presentan también resultados de difusión a través del conducto de cultivos de células de Schwann, Figuras 4 y 5.

REIVINDICACIONES

1. Un andamiaje tubular implantable degradable y biocompatible caracterizado por que comprende tres capas de porosidad diferente: una capa interna a), una capa intermedia b) y una capa externa c), con continuidad entre ellas, y compuestas las tres por un mismo hidrogel poroso basado en ácido hialurónico reticulado.
2. Andamiaje tubular según la reivindicación 1, caracterizado por que las capas de hidrogel poroso presentan una porosidad:
 - la capa interna a) tiene microporos de inferiores a 1 μm ;
 - la capa intermedia b) tiene poros interconectados de mayor tamaño que los de las capas interna y externa, en forma de panal, de tamaño entre 10 y 70 μm y
 - la capa externa c) tiene poros irregulares de tamaño inferior a 12 μm .
3. Un andamiaje tubular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que tiene un diámetro interno con unas dimensiones de alrededor de 400 μm y una longitud de hasta 50 mm.
4. Biohíbrido caracterizado por que comprende un andamiaje tubular definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. Biohíbrido según la reivindicación 4, caracterizado por que comprende células de Schwann o glía envolvente olfatoria en su interior.
6. Biohíbrido según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que además comprende factores de crecimiento y/o fármacos en su lumen.
7. Biohíbrido según la reivindicación 6, caracterizado por que los factores de crecimiento están seleccionados entre neurotrofinas NGF, BDNF o GDNF
8. Biohíbrido según una la reivindicación 6, caracterizado por que los fármacos son dopaminérgicos.
9. Biohíbrido según la reivindicación 6, caracterizado por que los factores de crecimiento y/o los fármacos se encuentran en el lumen embebidos en geles o micropartículas.
10. Biohíbrido según la reivindicación 9, caracterizado por que los geles son péptidos inyectables y gelificables in situ o disoluciones de hidrogeles, preferentemente fibrina, colágeno o agarosa.
11. Biohíbrido según la reivindicación 9, caracterizado por que las micropartículas tienen carácter hidrófilo.
12. Biohíbrido según la reivindicación 9, caracterizado por que las micropartículas tienen carácter hidrófobo.
13. Biohíbrido según la reivindicación 9, caracterizado por que las micropartículas son de PLLA o de gelatina entrecruzada.
14. Biohíbrido según una de las reivindicaciones 4 a 13, caracterizado por que comprende microfilamentos de poliésteres sintéticos degradables de nylon o de seda de diámetros desde micras a decenas de micras, dispuestos en paralelo en el lumen, que sirven de soporte para la adhesión y guía a la migración de células y la extensión de axones.
15. Procedimiento para obtener el andamiaje tubular definido en una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende:
 - disponer un molde con ranuras para contener dicho andamiaje tubular,
 - introducir en dicho molde un material polimérico en forma de fibra(s),
 - preparar disoluciones de HA y agitarlas en presencia de un agente de entrecruzamiento,
 - inyectar dichas disoluciones en las ranuras del molde, obteniendo un conjunto molde-soluciones que reticula in situ,
 - congelar el conjunto obtenido molde-soluciones, y
 - liofilizar el conjunto molde-soluciones obteniendo matrices microporosas de HA.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado por que:
 - el molde es de material polimérico hidrófobo

- el material polimérico en forma de fibras es de material polimérico hidrófobo
 - el agente de entrecruzamiento es divinil sulfona, glutaraldehído o carbodiimida.
17. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado por que:
- el molde es de politetrafluoroetileno
- 5 - el material polimérico en forma de fibras es de poli- ϵ -caprolactona
- el agente de entrecruzamiento es divinil sulfona, glutaraldehído o carbodiimida.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado por que comprende después de la etapa de liofilización:
- retirar el andamiaje tubular del molde y los anillos de material que constituye el propio molde
- 10 - retirar la fibra de material polimérico, obteniendo un conducto con un canal interior centrado, e
- hidratar los conductos de HA.
19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado por que comprende después de la etapa de hidratación, la inserción de fibras de PLLA en su interior.
20. Un andamiaje tubular definido en una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se obtiene mediante un procedimiento como el definido en una de las reivindicaciones 15 a 19.
- 15
21. Un andamiaje tubular definido en una de las reivindicaciones 1 a 3 o un biohíbrido definido en una de las reivindicaciones 4 a 14, para su uso en la inducción de la regeneración de tractos neurales y la reconexión de poblaciones neuronales dañadas o degeneradas.
22. Un andamiaje tubular definido en una de las reivindicaciones 1 a 3 o un biohíbrido definido en una de las reivindicaciones 4 a 14 para su uso en la regeneración de tractos en enfermedades que afectan al sistema nervioso central, preferentemente, la enfermedad de Parkinson y lesiones medulares.
- 20

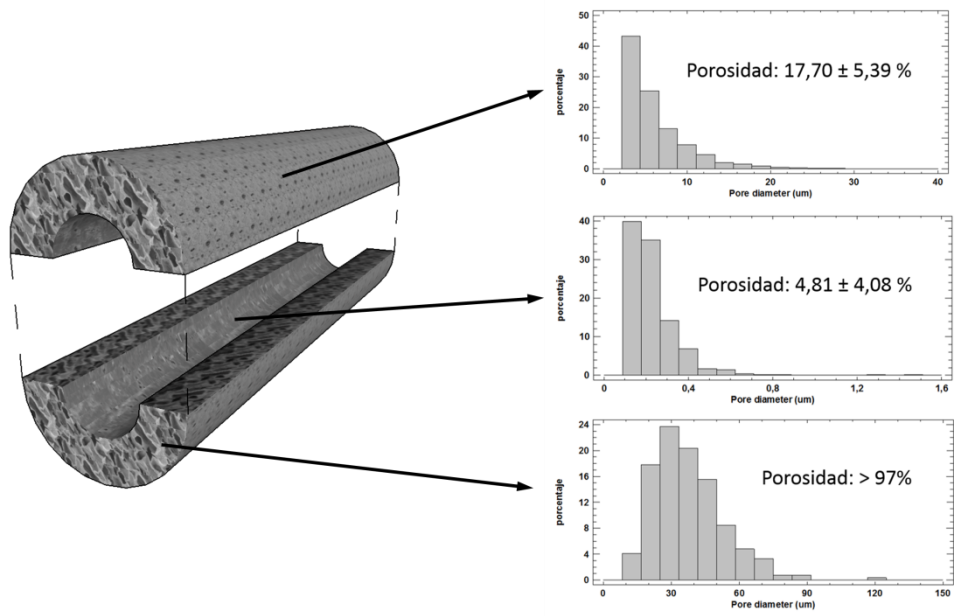


Fig. 1

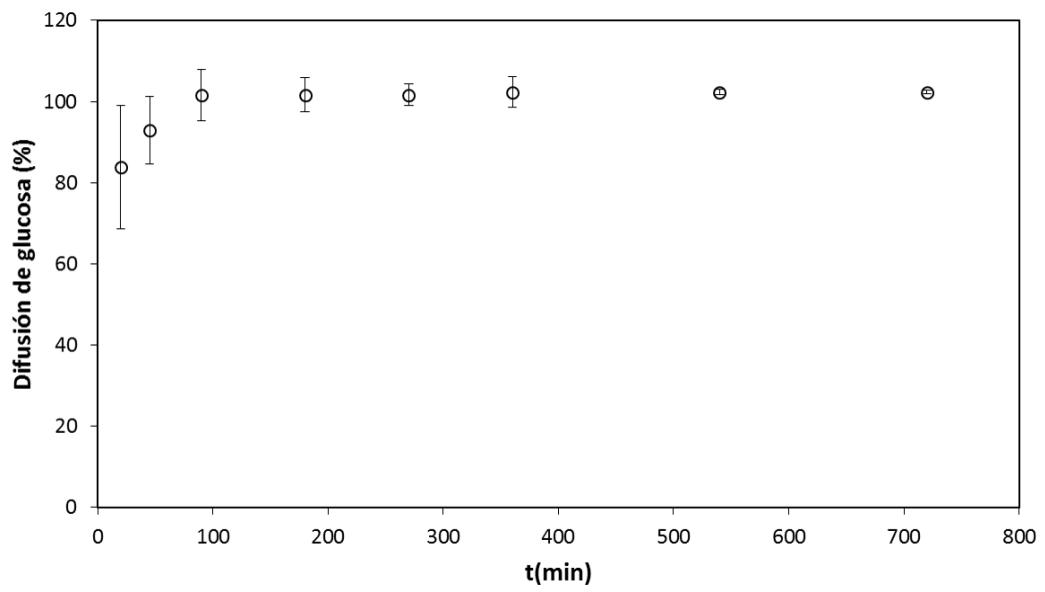


Fig. 2

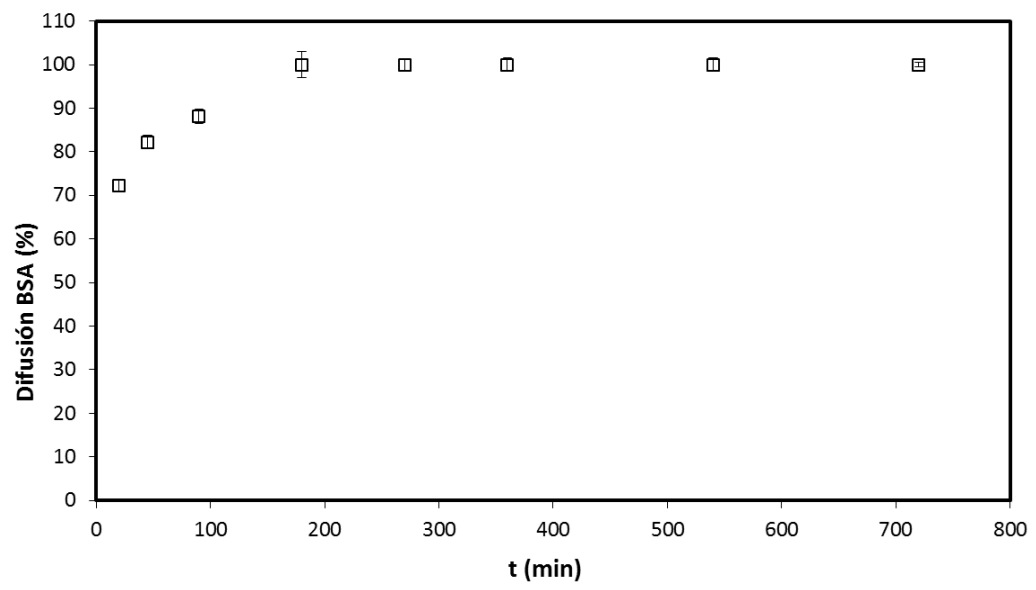


Fig. 3

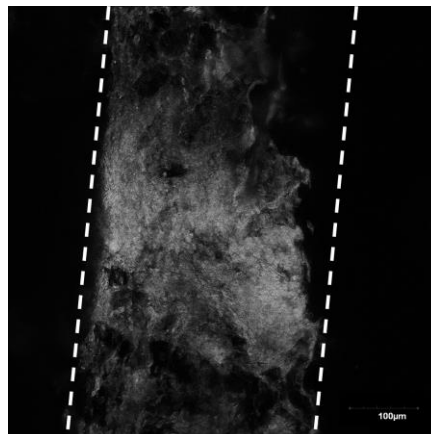


Fig. 4

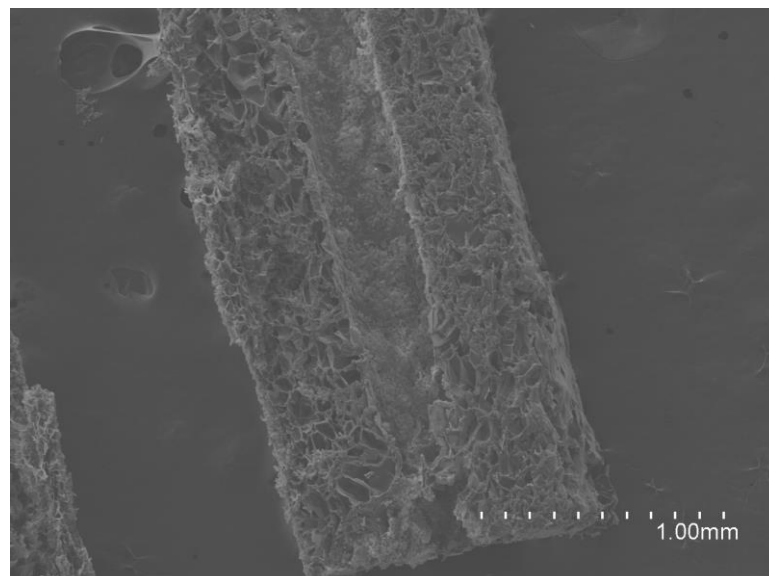


Fig. 5