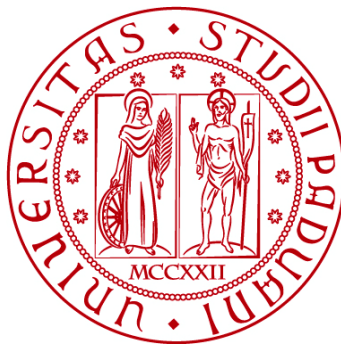


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**SVILUPPO, CARATTERIZZAZIONE E VALUTAZIONE PRECLINICA DI UNA
NEUROGUIDA IBRIDA IN PVA OSSIDATO/NANOTUBI DI CARBONIO PER
LA RIGENERAZIONE DEL NERVO PERIFERICO**

**Tutor: Prof.ssa Elena Stocco
Dipartimento di Neuroscienze**

**Co-tutor: Prof.ssa Silvia Barbon
Dipartimento di Neuroscienze**

Laureanda: Anna Tonon

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

Indice

ABSTRACT	3
1. STATO DELL'ARTE.....	5
1.1 Anatomia del nervo periferico.....	5
1.2 Lesioni del nervo periferico.....	6
1.3 Strategie di riparazione delle lesioni ai nervi periferici	7
1.3.1 Condotti nervosi.....	8
2. MATERIALI E METODI.....	9
2.1 Preparazione dell'OxPVA.....	9
2.2 Funzionalizzazione dei MWCNT	9
2.3 Preparazione e caratterizzazione dei condotti nervosi	9
2.3.1 Aspetto e ultrastruttura macroscopica	9
2.3.2 Test di ritenzione della sutura.....	10
2.3.3 Impianto dei condotti nervosi in un modello animale di lesione del nervo periferico.....	10
2.4 Salute degli animali e recupero della funzionalità.....	11
2.4.1 Peso degli animali.....	11
2.4.2 Valutazione dell'indice funzionale sciatico.....	11
2.4.3 Recupero dei condotti nervosi e analisi del sito chirurgico	11
2.4.4 Caratterizzazione istologica del tessuto rigenerato.....	12
2.5 Immunoistochimica	12
2.6 Immunofluorescenza.....	12
2.7 Studio morfometrico	13
2.8 Analisi del muscolo gastrocnemio.....	13
2.9 Analisi statistica	14
3. RISULTATI.....	15
3.1 Distribuzione di MWCNT-S in OxPVA.....	15
3.2 Aspetto dei condotti nervosi	15
3.3 Resistenza alla sutura	16
3.4 Riparazione chirurgica del nervo sciatico lesionato.....	16
3.5 Risposta comportamentale agli impianti e valutazione del recupero funzionale.....	17
3.6 Valutazione dei campioni recuperati	18
3.7 Analisi morfometrica.....	21
3.8 Peso del muscolo gastrocnemio.....	24
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	25
4.1 Discussione	25
4.2 Conclusioni.....	27
5. Bibliografia	29
6. Appendice	31

ABSTRACT

Le lesioni gravi dei nervi periferici rappresentano un'importante sfida clinica, spesso richiedendo l'uso di condotti nervosi (NC) artificiali quando la riparazione diretta non è possibile. In questo contesto la ricerca bioingegneristica mira a sviluppare dispositivi che integrino stimoli fisici e chimici per favorire la ricrescita assonale anche nelle situazioni più critiche rappresentate dalla neurotmesi, ovvero la completa interruzione di continuità del nervo. Nell'articolo preso in considerazione in questo elaborato, vengono descritti lo sviluppo e la validazione in vivo di un nuovo condotto nanocomposito ibrido basato su una matrice polimerica di polivinil alcol ossidato (OxPVA)(grado di ossidazione 1%) arricchita con nanotubi di carbonio multi-wall idrosolubili (MWCNT-S) allo 0,1% in peso. L'aggiunta di MWCNT-S mira a fornire stimoli elettrici e strutturali favorevoli all'interazione cellula-scaffold senza indurre citotossicità, grazie ad una funzionalizzazione chimica che ne garantisce una dispersione uniforme nella matrice polimerica verificata mediante analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Dopo una preliminare caratterizzazione del biomateriale, l'efficacia del condotto OxPVA+MWCNT-S nella rigenerazione del nervo è stata valutata attraverso uno studio preclinico in un modello di lesione severa (ratti Sprague-Dawley, gap: 5 mm). Le neuroguide in OxPVA+MWCNT-S sono state comparate con device in OxPVA e Autograft (Reverse Autograft). A 6 settimane dalla chirurgia i risultati associati agli impianti sono stati verificati tramite studi istologici, immunoistochimici, di immunofluorescenza e morfometrici su sezioni semifini. Tutti gli impianti hanno supportato la rigenerazione nervosa senza indurre reazioni infiammatorie gravi; lo studio morfometrico ha mostrato una densità di assoni mielinici nei condotti OxPVA+MWCNT-S superiore rispetto agli altri gruppi. Inoltre, l'analisi di g-ratio ha rivelato per il condotto ibrido valori paragonabili al Reverse Autograft, suggerendo quindi un processo di rimielinizzazione efficace. Il recupero funzionale motorio (SFI) e l'atrofia muscolare del gastrocnemio sono risultati confrontabili nell'intera coorte. In conclusione, l'incorporazione dei MWCNT-S in matrici di OxPVA si è dimostrata una strategia promettente per migliorare l'esito morfo-strutturale della rigenerazione del nervo dopo lesione severa.

1. STATO DELL'ARTE

1.1 Anatomia del nervo periferico

Il sistema nervoso è una unità morfo-funzionale e strutturale caratterizzata da un tessuto altamente specializzato nella ricezione, elaborazione e trasmissione degli stimoli all'intero organismo. Esso si suddivide in sistema nervoso centrale (SNC), composto da encefalo e midollo spinale, e sistema nervoso periferico (SNP) composto da gangli e nervi. Mentre le funzioni dell'SNC sono principalmente l'integrazione, l'elaborazione dei dati e la conseguente generazione dell'output motorio e comportamentale, la funzione dell'SNP è quella di collegamento tra l'SNC e l'intero organismo per poter trasmettere gli stimoli motori e sensitivi.

Entrambi i sistemi sono costituiti da cellule estremamente differenziate: i neuroni e le cellule della neuroglia. I neuroni, in quanto cellule eccitabili e deputate alla trasmissione dei segnali tramite impulsi elettrici, svolgono la loro funzione nel sistema nervoso periferico (SNP) in stretta collaborazione con le cellule gliali. In particolare, le cellule di Schwann producono la mielina che avvolge gli assoni neuronali, favorendo una conduzione più rapida ed efficiente dell'impulso nervoso, mentre le cellule satelliti circondano i corpi cellulari dei neuroni nei gangli periferici, regolando gli scambi di sostanze tra i neuroni e l'ambiente circostante e contribuendo al mantenimento dell'omeostasi locale. Dal punto di vista strutturale, il nervo non è un semplice fascio di assoni, ma una porzione anatomica in cui la componente neuronale è integrata ad un sistema di membrane connettivali indispensabili nell'isolamento elettrico, nella protezione meccanica e nel supporto metabolico. L'endonevrio, costituito da tessuto connettivo lasso, avvolge i singoli assoni e le cellule di Schwann associate; il perinevrio, composto da cellule connettivali pavimentose unite da giunzioni serrate, circonda un insieme di assoni ed è particolarmente importante nel mantenimento del microambiente endonevrionale; infine l'epinevrio, composto da una spessa guaina di tessuto connettivo fibroso e denso, racchiude i diversi fascicoli nervosi e contiene una rete vascolare fitta essenziale per lo scambio di nutrienti e macromolecole [1] (Figura 1).

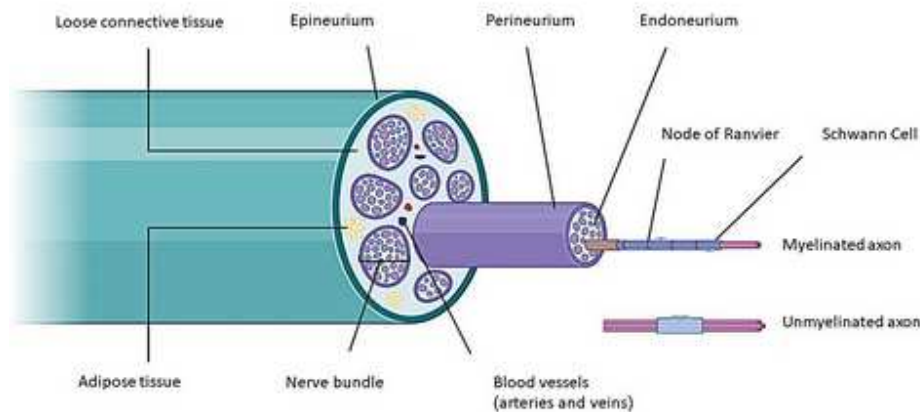


Figura 1. Struttura microscopica di un nervo periferico [5].

1.2 Lesioni del nervo periferico

Il sistema nervoso periferico è caratterizzato da un'architettura molto complessa ed è soggetto a particolare vulnerabilità. Esso può essere lesionato da tagli profondi, stirature, schiacciamento o ischemia [2] con un numero di nuovi casi/anno superiore ai 5 milioni [4].

La separazione di una fibra nervosa dal suo corpo cellulare induce distalmente alla lesione la disgregazione dell'assone e del suo rivestimento mielinico; inoltre, la perdita della comunicazione nervosa incide direttamente sulla funzione muscolare causando atrofia e disabilità nei pazienti [1,4].

In caso di lesione di un nervo periferico, è fondamentale valutarne e classificarne il livello, l'entità e il potenziale di recupero, al fine di individuare le strategie terapeutiche più appropriate e massimizzare le possibilità di un esito favorevole.

Quando si parla di interruzione della conduzione nervosa, due sono le classificazioni storiche che ancora oggi guidano le prognosi: la classificazione di Seddon (1943) e la classificazione di Sunderland (1951). La prima suddivide le lesioni in 3 grandi categorie, sulla base di un giudizio macroscopico e clinico. La neuropraxia comporta un temporaneo blocco della conduzione nervosa da compressione prolungata o leggero stiramento, non è un vero e proprio danno al nervo, il quale rimane integro e il recupero è rapido e spontaneo. L'assonotmesi è una lesione intermedia in cui l'assone viene danneggiato ma le guaine connettivali rimangono integre; il recupero è possibile e spontaneo ma avviene molto lentamente. La neurotmesi si verifica a seguito di traumi violenti o ferite profonde, sia l'assone sia le guaine sono completamente interrotti; il recupero è impossibile senza un intervento chirurgico che preveda la sutura chirurgica dei monconi o il posizionamento di un innesto. La

seconda classificazione, invece, comprende 5 gradi (I, II, III, IV, V) i quali considerano più nel dettaglio il grado di coinvolgimento delle strutture connettivali del nervo. Grado I: corrisponde alla neuropraxia di Seddon, c'è una semplice interruzione temporanea della conduzione del segnale; grado II: corrisponde all'assonotmesi di Seddon, l'assone si interrompe e va incontro a degenerazione Walleriana ma le membrane rimangono integre; grado III: si interrompono l'assone e l'endonevrio con rischio di traiettorie sbagliate degli assoni in crescita durante il recupero spontaneo che spesso risulta incompleto; grado IV: interruzione di assone, endonevrio e perinevrio, solo l'epinevrio rimane integro; il recupero spontaneo è impossibile senza un intervento chirurgico che asporti la cicatrice e ripari i fascicoli; grado V: corrisponde alla neurotmesi di Seddon, si ha completa interruzione del nervo nella sua interezza, comprese tutte le membrane connettivali, il recupero richiede chirurgia di sutura o innesto. [3]

1.3 Strategie di riparazione delle lesioni ai nervi periferici

Quando un nervo periferico viene danneggiato in modo severo, la sua continuità può essere ripristinata mediante tecniche di chirurgia standard e avanzate. Diversamente dal SNC, il SNP ha un'intrinseca capacità di rigenerazione, ma risulta piuttosto lenta e richiede spesso un intervento chirurgico di supporto per un corretto recupero.

Nell'eventualità di lesioni nette, con una perdita di sostanza inferiore ai 3 mm, è possibile ripristinare la continuità del nervo attraverso sutura diretta (neurorrafia o sutura end-to-end), purché non si crei tensione tra i due monconi; la sutura potrà coinvolgere solo l'epinevrio oppure i singoli fascicoli. Diversamente, nel caso di gap con perdita di sostanza, ove la sutura non è indicata, vengono utilizzate delle alternative come l'autoinnesto o il posizionamento di neuroguide. L'autoinnesto (autograft) rappresenta il gold standard e consiste nel posizionamento di un segmento di nervo autologo; molto utilizzato è il nervo surale. Tale approccio garantisce la massima biocompatibilità dell'impianto tuttavia tra le criticità si include la seconda chirurgia per il prelievo, la lunghezza contenuta del segmento isolabile e il possibile mis-match dimensionale tra il nervo prelevato e il sito di impianto. Ciò ha spinto la ricerca verso l'identificazione di soluzioni alternative.

I condotti nervosi sono device tubulari che permettono la riconnessione dei due monconi e creano un microambiente favorevole, guidando così la rigenerazione. Essi possono essere costituiti da materiali biologici come il collagene, la sottomucosa intestinale, il chitosano; o sintetici, quali polimeri biodegradabili con un tempo di riassorbimento compatibile con la rigenerazione del nervo (PVA, PGA, PLCL) [4].

Attualmente, la ricerca è fortemente orientata all'ottimizzazione dell'efficacia di tali dispositivi, con l'obiettivo di migliorare la qualità del tessuto rigenerato. A questo scopo, vengono studiate diverse strategie, tra cui l'integrazione di fattori di crescita, fondamentali per stimolare la rigenerazione assonale; l'impiego di terapie cellulari, come la semina di cellule staminali all'interno dei condotti nervosi; e l'utilizzo di scaffold ingegnerizzati, idrogel o microfibre inseriti nel lume del condotto, in grado di guidare e orientare la crescita degli assoni.

1.3.1 Condotti nervosi

Per superare le criticità legate all'utilizzo degli autoinnesti, sono stati sviluppati diversi condotti con l'obiettivo di costituire alternative "on-the-bench" sicure. Tuttavia, rispetto ai prodotti approvati per l'uso clinico dalla Food and Drug Administration (FDA), nessuno è in grado di garantire risultati pienamente soddisfacenti.

Ad oggi, quattro sono i tipi di design di condotti promettenti:

- 1) A parete porosa: importante nel trasporto di sostanze nutritive, e di scarto oltre che di fattori di crescita, tuttavia la dimensione dei pori è difficilmente controllabile durante la fabbricazione;
- 2) A parete scanalata: promuovono l'allineamento corretto dei neuroni grazie alla morfologia della superficie; tuttavia, sono molto difficili da produrre;
- 3) Con lume multi-canale: promuovono l'attaccamento delle cellule di Schwann e il rilascio dei fattori di crescita ma sembra che riducano la permeabilità e la flessibilità meccanica dei condotti;
- 4) Con filler luminale: spesso vengono usati polimeri naturali come collagene, laminina o agarosio. Essi formano idrogel o spugne porose, all'interno del condotto ma la loro efficacia varia a seconda della distanza specifica del difetto nervoso.

Infine, l'integrazione di elementi in grado di fornire una stimolazione elettrica al dispositivo e, di conseguenza, al sito di impianto, è emersa come una strategia promettente per supportare la rigenerazione di diversi tessuti. Tale approccio consente infatti di modulare l'attività cellulare e di favorire i processi rigenerativi, promuovendo anche la crescita e il recupero assonale[4].

2. MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione dell'OxPVA

Una quantità pesata di polvere PVA (peso molecolare 146.000-186.000 Da, 99+% idrolizzato) è stata sospesa in acqua MilliQ e solubilizzata. La soluzione è stata parzialmente ossidata aggiungendo una soluzione acida di permanganato di potassio (KMnO_4) in ambiente acido per acido perclorico (HClO_4). La soluzione, dopo dialisi prolungata, è stata congelata a -20°C overnight e liofilizzata per conservazione a lungo termine. Per la preparazione della soluzione, l'OxPVA è stato pesato nella quantità del 16% p/p, sospeso in acqua Milli-Q e successivamente riscaldato a bagnomaria fino all'ebollizione, al fine di ottenere una completa dissoluzione del polimero.

2.2 Funzionalizzazione dei MWCNT

I MWCNT (ACS Material LLC, OD: $<8\text{nm}$, SKU# CMP00105) (50 mg, 4.16mmol di C) sono stati dispersi in una soluzione acquosa di solfanilato di sodio diidrato (48.1 mg 0.05 eq/mol C) (99% Sigma-Aldrich). Quindi, è stato aggiunto nitrito di isopentile (5.8 μL , 0.1 eq/mol C) (96% Sigma-Aldrich) e la reazione è stata condotta per 4 ore a 80°C sotto flusso di N_2 . Il prodotto ottenuto è stato recuperato attraverso filtrazione, lavato con acqua e metanolo.

2.3 Preparazione e caratterizzazione dei condotti nervosi

Tre grammi di idrogel di OxPVA sono stati combinati con la sospensione di MWCNT-S (0.1% in peso in OxPVA). La distribuzione omogenea dei MWCNT-S nella matrice polimerica è stata ottenuta mediante incorporazione meccanica. Successivamente i NC sono stati preparati con un metodo di cast moulding, aspirando l'OxPVA+MWCNT-S in uno stampo tubolare in acciaio inossidabile (lunghezza: 5 cm; diametro interno: 2.1 mm) dotato di un mandrino coassiale centrale (diametro: 1.2 mm). Il sistema è stato sottoposto a 6 cicli di congelamento-scongelo (un ciclo: congelamento a -20°C per 6h/ scongelamento a 22°C per 1h) che hanno portato al cross-linking fisico del polimero e alla formazione dei NC che sono stati quindi conservati a -20°C . La stessa procedura è stata ottenuta per ottenere gli scaffold di OxPVA privi di MWCNT-S, utilizzati come controlli.

2.3.1 Aspetto e ultrastruttura macroscopica

I NC di OxPVA e OxPVA+MWCNT-S sono stati confrontati per il loro aspetto macroscopico e sono poi stati analizzati al SEM (Scanning Electron Microscopy) per vederne l'ultrastruttura: i campioni, di lunghezza pari a 0,5 mm, sono stati fissati in una soluzione di

glutaraldeide al 2,5% in PBS 0,2 M (pH 7,4) per 24 ore. Successivamente, sono stati sottoposti a disidratazione mediante una serie di soluzioni di etanolo a concentrazione crescente, seguita da essiccaamento al punto critico. Infine, i campioni sono stati metallizzati con uno strato d'oro e osservati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando un sistema JSM-6490 (Jeol USA, Peabody, MA, USA).

La distribuzione spaziale dei MWCNT-S nell' OxPVA è stata valutata attraverso il microscopio elettronico a trasmissione (TEM): i campioni OxPVA+MWCNT-S sono stati fissati con glutaraldeide (EMS; Cat. No16220) al 2.5% in cacodilato di sodio, pH 7.4 ON a 4°C. Quindi, sono stati post-fissati con tetrossido di osmio al 1% in cacodilato di sodio per 1h a 4°C . Dopo tre lavaggi con acqua, i campioni sono stati disidratati con una scala crescente di alcoli e inclusi in una resina epossidica (Sigma-Aldrich 46345). Sezioni ultrasottili (60-70nm) sono state ottenute con un ultramicrotomo Leica Ultracut EM UC7 e controcolorate con acetato di uranile e citrato di piombo prima di essere visualizzate con microscopio elettronico a trasmissione Tecnai G2 (FEI) operante a 100 kV. Le immagini sono state ottenute con una fotocamera digitale Veleta (Olympus Soft Imaging System).

2.3.2 Test di ritenzione della sutura

La resistenza alla sutura degli idrogel in OxPVA e OxPVA+MWCNT-S è stata testata con test di ritenzione della sutura (SR), valutando 5 campioni per ogni gruppo sperimentale con lo strumento Bose ElectroForce® Planar Biaxial Test Bench (TA Instruments, New Castle, USA) in modalità di trazione uni-assiale. Dopo il cross-linking, entrambe le membrane di idrogel sono state tagliate in campioni rettangolari (34x8x0.6 mm). Lo spessore dei campioni è stato selezionato per essere uguale allo spessore della parete del condotto nervoso, mentre la geometria del campione è stata semplificata. I campioni sono stati successivamente suturati utilizzando fili di Nylon 9-0. Un'estremità del filo di sutura è stata fissata alla pinza del sistema di prova, mentre il bordo opposto del campione è stato bloccato. La lunghezza iniziale del tratto sottoposto a trazione era di 24 mm, costituita da 20 mm di membrana di idrogel e 4 mm di filo di sutura. Tutti i test SR sono stati eseguiti in condizioni quasi statiche con velocità di allungamento di 0.12mms^{-1} .

2.3.3 Impianto dei condotti nervosi in un modello animale di lesione del nervo periferico

Tutte le procedure sugli animali sono state approvate del comitato etico dell'Università di Padova, in accordo con le linee guida del Ministero Italiano della salute (Autorizzazione n.837/2019-PR, 9 dicembre 2019).

Quindici ratti Sprague-Dawley adulti sono stati divisi casualmente in tre gruppi sperimentali, 5 ratti ciascuno: Reverse Autograft, OxPVA, OxPva+MWCNT-S. In breve, gli animali sono stati anestetizzati con una miscela di isoflurano/ossigeno, il nervo sciatico sinistro è stato esposto e sezionato lasciando un gap di 5 mm. Nel caso del Reverse Autograft il nervo sciatico, invertito, è stato reimpiantato usando suture in Nylon 9-0; nel caso dei condotti (lunghi 10 mm), questi sono stati posizionati in modo da connettere il moncone prossimale e distale e sono stati suturati all'epinevrio con suture in Nylon 9-0. Dopo l'intervento i ratti sono stati lasciati recuperare in gabbia nei cinque giorni successivi con un ambiente e dieta adeguati e somministrando loro una terapia appropriata antinfiammatoria e antibiotica (Rimadyl® e Baytril® rispettivamente). L'eutanasia è stata effettuata mediante somministrazione di anidride carbonica a 6 settimane dall'intervento chirurgico. Gli impianti sono stati valutati in situ per eventuali rotture, integrità o segni di infiammazione; sono stati quindi isolati e processati per le analisi successive. Due campioni per gruppo sono stati fissati per l'analisi istologica, immunoistochimica e di immunofluorescenza, mentre 3 campioni per gruppo sono stati processati per la preparazione di sezioni semifine, per lo studio morfometrico e l'analisi al TEM. I muscoli gastrocnemi sono stati comparati per l'aspetto macroscopico e per il peso.

2.4 Salute degli animali e recupero delle funzionalità

2.4.1 Peso degli animali

Per verificare il benessere degli animali, il loro peso è stato misurato al giorno n.0, n.20 e n.42 dall'intervento chirurgico.

2.4.2 Valutazione dell'indice funzionale sciatico

L'indice SFI è stato utilizzato per valutare il recupero motorio del nervo sottoposto a intervento. A tal fine, le zampe posteriori dei ratti sono state colorate con inchiostro nero e gli animali sono stati fatti camminare lungo un corridoio rivestito di carta bianca, in modo da ottenere le impronte necessarie per l'analisi funzionale. L'SFI è stato determinato con la formula di Bain et al. considerando le impronte delle zampe normali e delle zampe operate. Un punteggio di 0 è associato a normale funzione nervosa, uno di -100 è associato a disfunzione motoria totale del nervo sciatico.

2.4.3 Recupero dei condotti nervosi e analisi del sito chirurgico

Al termine dell'esperimento gli impianti sono stati considerati in situ per la presenza d'infiammazione e aderenze perineurali. Le aderenze sono state valutate secondo Petersen et al. Specificatamente: grado 1: minime

aderenze che non richiedono dissezione o richiedono una dissezione minima; grado 2: aderenze moderate che richiedono vigorosa dissezione senza strumenti taglienti; grado 3: aderenze significative che richiedono strumenti taglienti per la dissezione.

2.4.4 Caratterizzazione istologica del tessuto rigenerato

Una volta raccolti, due campioni per gruppo sono stati fissati in formalina al 10% (p/v) in PBS. La porzione centrale dei campioni è stata quindi isolata, inclusa in paraffina e sezionata (sezioni trasversali seriali di 4µm). L'aspetto generale e la presenza di tessuto fibro-connettivale sono stati indagati, rispettivamente, mediante colorazione con ematossilina-eosina (H&E) e Azan Mallory.

2.5 Immunoistochimica

Le porzioni centrali dei campioni sono state analizzate mediante immunoistochimica utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti-CD3 (anticorpo policlonale di coniglio, A0452, Dako®, Milano, Italia; diluizione 1:500) e anti-F4/80 (anticorpo policlonale di coniglio anti-topo, sc-26643-R, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; diluizione 1:800), impiegati per evidenziare rispettivamente linfociti e macrofagi; anti-S100 (anticorpo policlonale di coniglio, Z0311, Dako®; diluizione 1:5000), utilizzato per identificare le cellule di Schwann; anti-βIII-tubulina (anticorpo policlonale di coniglio contro la βIII-tubulina neuronale, PRB-435P, Covance, Princeton, NJ, USA; diluizione 1:1000) e anti-neurofilamento a catena pesante (NEFH) (anticorpo monoclonale ricombinante di coniglio, ab207176, Abcam, Cambridge, Regno Unito; diluizione 1:1000), utilizzati per confermare la presenza degli assoni.

Per tutti gli anticorpi, ad eccezione dell'anti-S100, è stato eseguito il recupero antigenico mediante incubazione in tampone citrato di sodio 10 mM (pH 6,0) a 90 °C per 10 minuti. Successivamente, le sezioni sono state incubate in una soluzione bloccante costituita da albumina sierica bovina (BSA) e siero normale di capra allo 0,5% (p/v) per 30 minuti a temperatura ambiente, al fine di ridurre i legami aspecifici. Le sezioni sono state quindi incubate con gli anticorpi primari sopra descritti per 1 ora a temperatura ambiente.

2.6 Immunofluorescenza

La qualità del tessuto rigenerato è stata verificata su sezioni longitudinali, mediante immunofluorescenza. Sono stati usati, a tale scopo, i marcatori S-100 (anti-S100 policlonale di coniglio; Z 0311; Dako®, diluito 1:3000) e PGP9.5 (anti-PGP9.5 policlonale di topo; Dako®, diluito 1:300). Dopo smascheramento (tampone di citrato di sodio 10mM, pH 6.0, a 95 °C per

10 min), i campioni sono stati immersi in una soluzione di quenching (133.76 mg di NH_4Cl in 50 ml di dH_2O per 10 min a TA) per ridurre le fluorescenza di fondo delle molecole native. Dopo il lavaggio in PBS i campioni sono stati trattati con soluzione permeabilizzante e di blocking (15% v/v siero di capra, 2% p/v BSA, 0.25% p/v gelatina, 0.2% p/v glicina in PBS) contenente 0.5% di TritonX-100 (1h a TA). Successivamente, le sezioni sono state incubate con gli anticorpi primari overnight a 4 °C. Gli anticorpi secondari Alexa Fluor Plus 568 anti-coniglio (A11011, segnale rosso) e Alexa Fluor Plus 488 di capra anti-topo (A32723, segnale verde) sono stati diluiti 1:200 in una soluzione contenente 5% BSA e 0,05% Triton X-100 e incubati per 1 ora a temperatura ambiente.

I segnali immunofluorescenti sono stati rilevati e acquisiti mediante microscopia confocale a scansione laser (Leica SP5).

2.7 Studio morfometrico

L'esito rigenerativo associato a diversi impianti è stato verificato attraverso uno studio morfometrico. Tre campioni per gruppo sono stati fissati in glutaraldeide al 2.5% (p/v) in PBS 0.1M, divisi in 4 segmenti e post-fissati in 1% di tetrossido di osmio (Agar Scientific Elektron Technology, UK) in 0.1M di tampone fosfato. Dopo la disidratazione in una serie a concentrazione crescente di alcol, i campioni sono stati inclusi in una resina epossidica; ne sono state tagliate delle sezioni semifini (05.µm) con l'ultramicrotomo RMC-PTX PowerTome (Boeckeler Instruments , AZ, USA) quindi colorate con blu di toluidina all'1%. Le immagini sono state acquisite con il microscopio Leica DMR. Le sezioni trasversali sono state comparate per: area totale media della sezione trasversale (µm²), area fascicolare (µm²), e area della guaine epineurale (%) ([area totale della sezione-area fascicolare]*100). Cinque quadranti casuali nell'area fascicolare sono stati selezionati e tre campi ad alto ingrandimento sono stati usati per calcolare in numero totale di assoni mielinizzati, la densità media degli assoni mielinizzati (assoni/µm²) e il g-ratio (diametro degli assoni/diametro delle fibre). Le misurazioni sono state condotte con il software ImageJ. In parallelo, sono stati allestiti i campioni per l'analisi al TEM (Hitachi H-300).

2.8 Analisi del muscolo gastrocnemio

I muscoli gastrocnemi, isolati dall'arto operato e dal controlaterale di ciascun animale, sono stati isolati e il loro peso umido è stato registrato con una bilancia elettronica. Quindi, il peso del muscolo operato è stato espresso come percentuale rispetto al peso del controlaterale.

2.9 Analisi statistica

I risultati sono presentati come le $\text{media} \pm \text{SD}$ di almeno tre repliche per ogni esperimento. Le analisi statistiche sono state effettuate con software Prism. Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state analizzate con metodi statistici parametrici e non parametrici. Per dati con distribuzione normale è stata usata l'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore, seguita dal test *post hoc* di Tukey, mentre per dati con distribuzione non-normale è stato applicato il test Kruskal-Wallis seguito dal test *post hoc* di Dunn. La significatività statistica è stata fissata a $P \leq 0.05$. I valori SRS dei due tipi di idrogel sono stati analizzati con un U test non parametrico Mann-Whitney, considerando $P\text{-value} \leq 0.05$. Analisi statistiche sono state effettuate mediante il programma MATLAB.

3. RISULTATI

3.1 Distribuzione di MWCNT-S in OxPVA

Per valutare la distribuzione spaziale dei MWCNT-S nella matrice polimerica, è stata effettuata un'analisi al TEM sia della membrana in OxPVA sia quella di in OxPVA+MWCNT-S. Dalle immagini, gli MWCNT-S appaiono come elementi tubuliformi individuali e uniformemente distribuiti (Figura 2). Ciò dimostra che l'approccio usato nella funzionalizzazione è efficace nel prevenire l'aggregazione dei nanotubi non in soluzione ma anche nella matrice solida, con un possibile impatto sulle proprietà fisiche del nanocomposito.

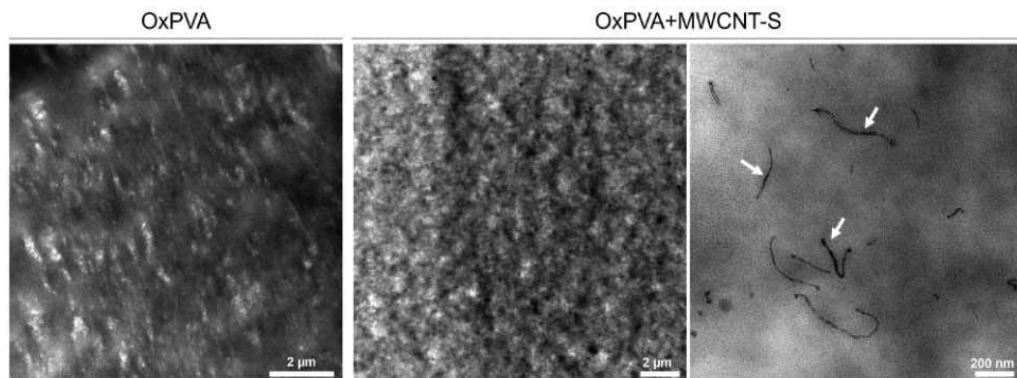


Figura 2. Immagini TEM di campioni di OxPVA e OxPVA+MWCNT-S acquisite a diversi ingrandimenti. Le frecce bianche mostrano i MWCNT-S all'interno della matrice polimerica. Scale bar: 2 µm; 200 nm.

3.2 Aspetto dei condotti nervosi

Inizialmente i device sono stati comparati per aspetto macroscopico e ultrastruttura.

Dopo l'estrazione dallo stampo, i dispositivi sono risultati manipolabili pur mantenendo la loro pervietà. La presenza dei MWCNT-S ha portato i NC ad assumere un colore più scuro; non sono state notate aree di agglomerazione suggerendo l'omogenea dispersione delle nanostrutture nella matrice polimerica. All'analisi al SEM i condotti di OxPVA hanno mostrato una superficie esterna e una sezione trasversale lisce, mentre la presenza dei MWCNT-S si è associata alla presenza di irregolarità nella parete esterna e alla presenza di nanopori nella sezione trasversale (Figura 3).

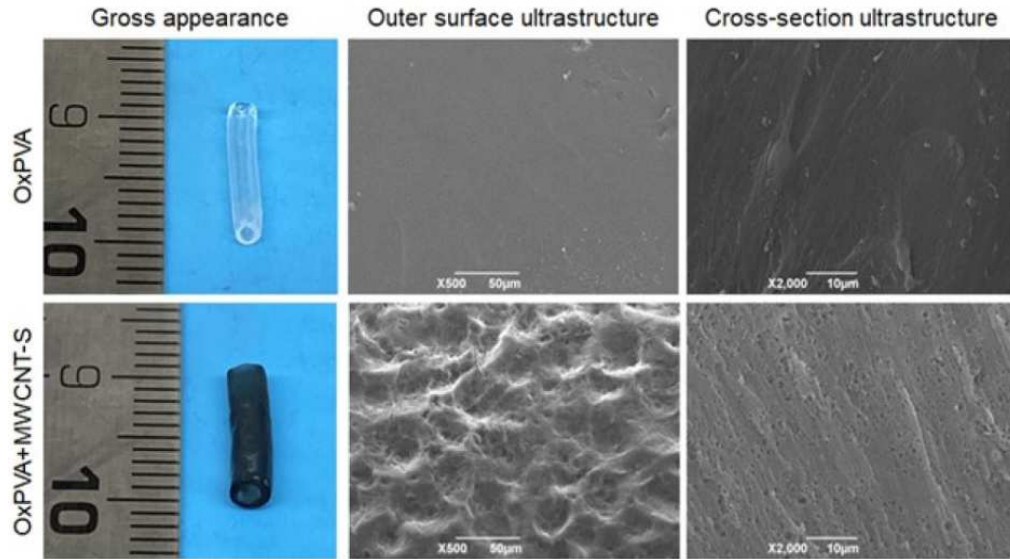


Figura 3. Aspetto macroscopico e ultrastruttura dei condotti nervosi in OxPVA e OxPVA+MWCNT-S riferiti sia alla superficie esterna (scale bar: 50 µm) che alla sezione trasversale (scale bar: 100 µm).

3.3 Resistenza alla sutura

I risultati del test di resistenza alla sutura, condotto sulle membrane di OxPVA e di OxPVA+MWCNT-S, sono mostrati in Figura 4. Questi test hanno permesso di identificare un range tra 0.23 e 0.27 N per l'OxPVA e tra 0.12 e 0.23 N per OxPVA+MWCNT-S. Non sono state rilevate differenze significative tra i due gruppi sperimentali ($P>0.05$).

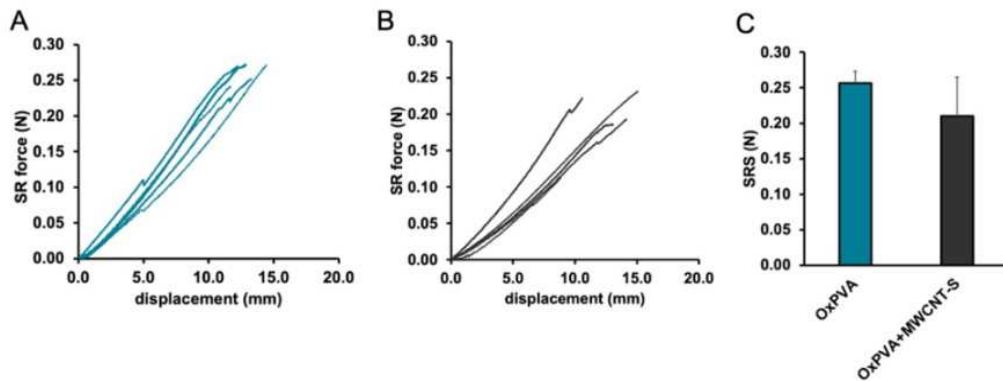


Figura 4. Forza di ritenzione della sutura in funzione dello spostamento per OxPVA (A) e OxPVA+MWCNT-S (B) fino alla fuoriuscita della sutura. Confronto dei valori di forza di ritenzione della sutura ($\pm$ DS) tra OxPVA e OxPVA+MWCNT-S(C).

3.4 Riparazione chirurgica del nervo sciatico lesionato

I condotti di OxPVA hanno dimostrato ottime performance in situ, adattandosi bene ai monconi nervosi, inoltre non si sono verificate rotture durante la sutura, né kinking dei condotti. Lo stesso si è verificato per quanto riguarda i condotti compositi in OxPVA+MWCNT-S. L'aspetto trasparente dei condotti di OxPVA ha facilitato il posizionamento in vivo;

il corretto posizionamento dei condotti di OxPVA+MWCNT-S è stato comunque possibile(Figura 5).

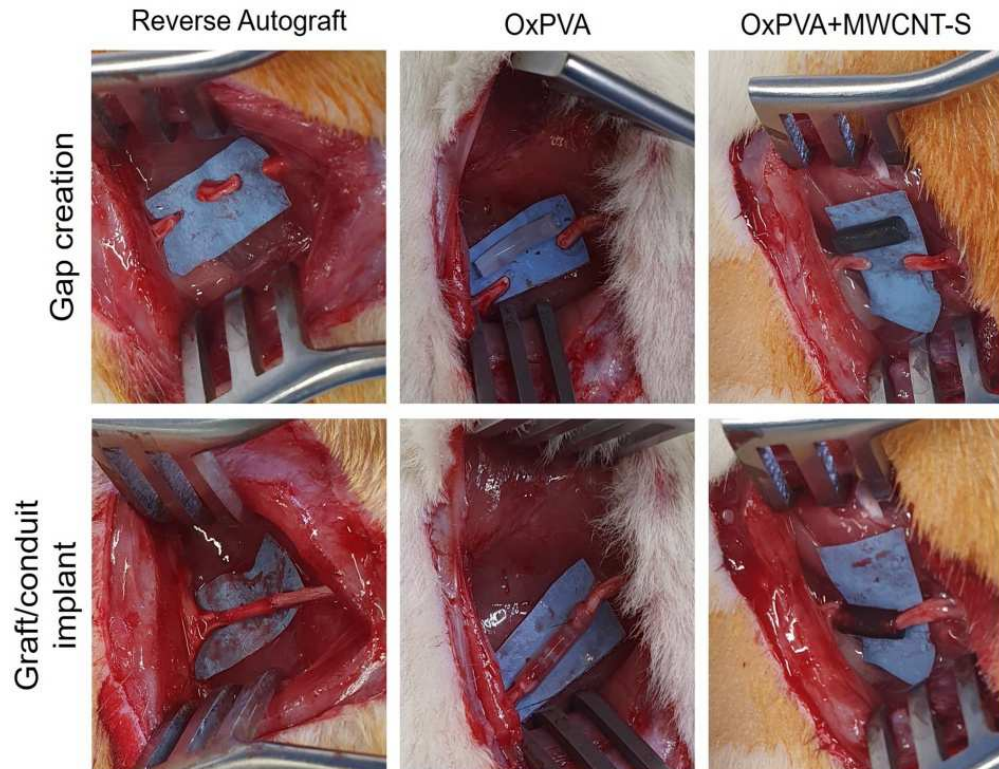


Figura 5. Impianti di Reverse Autograft, condotti nervosi in OxPVA e OxPVA+MWCNT-S nel modello di lesione del nervo sciatico di ratto Sprague-Dawley (gap: 5 mm).

3.5 Risposta comportamentale agli impianti e valutazione del recupero funzionale

La valutazione dello stato di salute dei ratti rappresenta un parametro importante per determinare la tollerabilità dell'intervento chirurgico, mentre il peso corporeo costituisce un indicatore fondamentale delle condizioni generali di salute degli animali(Figura 6A).

Il recupero della funzionalità nervosa è stato valutato mediante l'attribuzione punteggio SFI a 6 settimane dalla chirurgia, i cui valori sono risultati essere i seguenti: -78.70 ± 10.30 per il Reverse Autograft, -79.52 ± 9.73 per l'OxPVA e -82.20 ± 12.48 per OxPVA+MWCNT-S (Figura 6B).

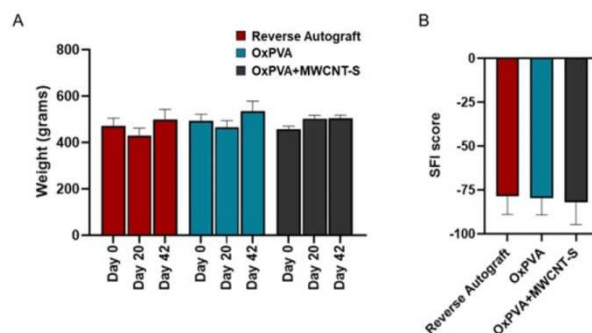


Figura 6. Valutazione del peso degli animali e del recupero funzionale. L'andamento del peso degli animali è stato valutato il giorno dell'intervento chirurgico (Giorno 0), a metà del periodo sperimentale (Giorno 20) e prima dell'endpoint sperimentale (Giorno 42) (A). Attribuzione del punteggio relativo all'indice di funzionalità del nervo sciatico (SFI) prima dell'eutanasia. Un SFI intorno a 0 suggerisce una normale funzione del nervo; un SFI intorno a -100 è associato a una disfunzione motoria totale del nervo sciatico (B). Non sono state osservate differenze statisticamente significative confrontando i gruppi sperimentali sia nel peso che nel punteggio SFI.

3.6 Valutazione dei campioni recuperati

Dopo l'eutanasia e l'esposizione del nervo sciatico, gli impianti sono stati osservati in situ. Le aderenze agli impianti sono state classificate di grado 2 per tutta la coorte. In seguito alla rimozione della capsula connettivale, i condotti sono apparsi ben posizionati, dimostrando la loro capacità nell'essere stabili una volta collocati in una regione ad alta mobilità come quella del nervo sciatico; inoltre, le estremità dei condotti hanno ben supportato le suture, senza segni di dislocazione. Non sono stati rilevati né tessuto cicatriziale, né presenza di neuroma. Una volta espunti, tutti i NC hanno dimostrato del tessuto rigenerato al loro interno, macroscopicamente visibile anche attraverso le pareti più scure dei condotti ibridi. Gli espunti, dopo colorazione con H&E, hanno confermato questa evidenza e, in parallelo, la colorazione Azan Mallory ha mostrato la presenza di tessuto connettivo (fibre collagene in blu) sia nell'epinevrio sia all'interno dei fascicoli, suggerendo la formazione di setti. L'analisi istologica ha mostrato inoltre l'aspetto del Reverse Autograft, caratterizzato dalla presenza di tre fasci separati da tessuto fibroconnettivale (Figura 7).

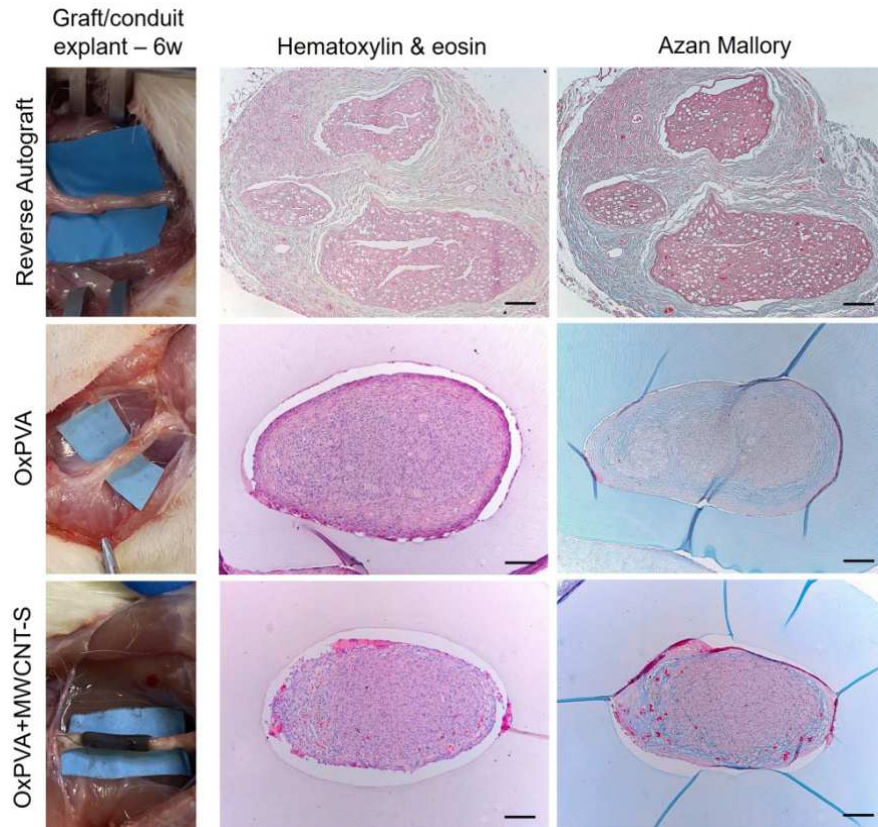


Figura 7. Reverse Autograft e condotti nervosi inOxPVA a 6 settimane dall'intervento. La colorazione con ematossilina ed eosina e Azan Mallory mostra l'aspetto generale e la presenza/distribuzione del tessuto fibro-connettivale in corrispondenza delle sezioni centrali degli espianti. Scale bar: 100 μ m.

In accordo con l'analisi immunoistochimica, è stata evidenziata solo una blanda immunopositività per i marker CD3 e F4/80, all'interno dei condotti. Per quanto riguarda il gruppo del Reverse Autograft, i linfociti e i macrofagi erano scarsi e identificabili in corrispondenza dei vasi (Figura 8).

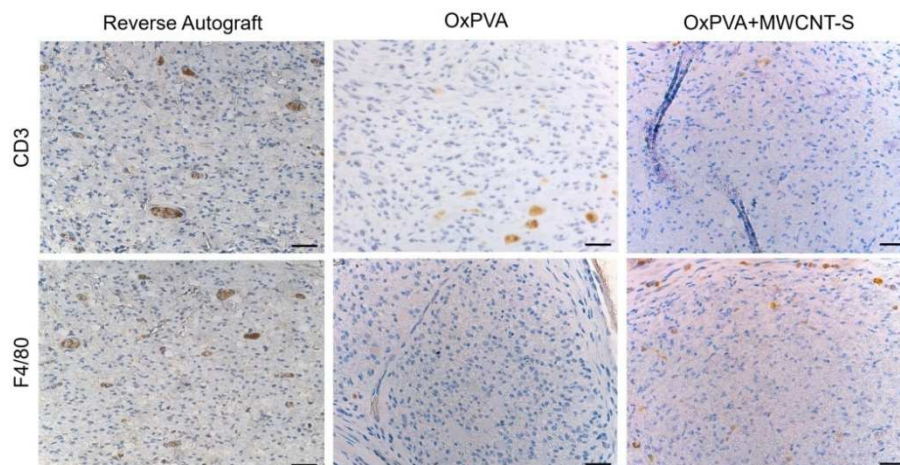


Figura 8. Immunolocalizzazione di elementi CD3 (linfociti) e F4/80 (macrofagi) positivi nella porzione centrale degli espianti. Scale bar: 25 μ m.

Tutte le porzioni centrali hanno mostrato immunoreattività per il marcatore S100 delle cellule di Schwann e per i marcatori assionali β -III-tubulina e NEFH. Inoltre, anche la presenza di cellule endoteliali, CD31-positive, è stata individuata nella coorte (Figura 9).

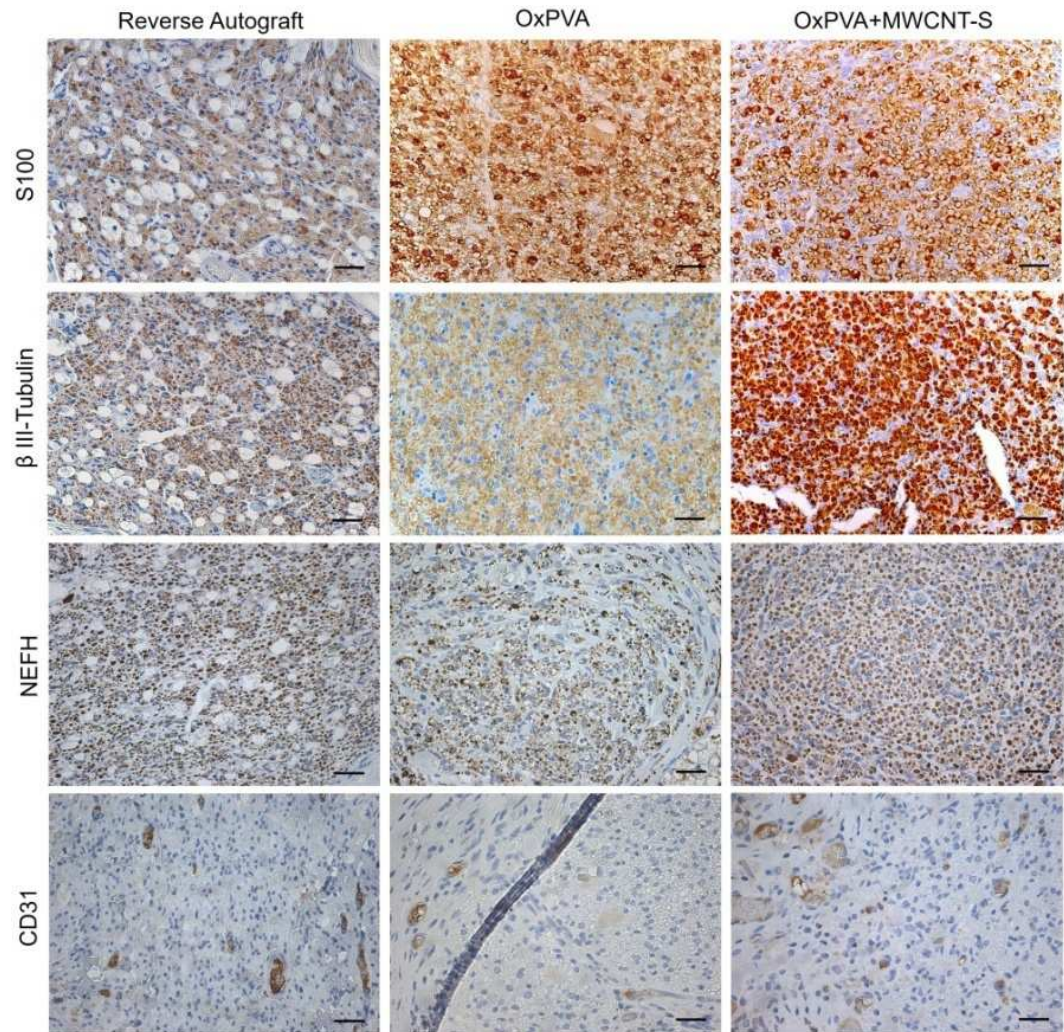


Figura 9. Immunolocalizzazione di S-100 (cellule di Schwann), β III-tubulina (assoni), NEFH (catena pesante del neurofilamento) e CD31 (cellule endoteliali) nella porzione centrale degli espianti. Scale bar: 100 μ m.

La rigenerazione nervosa attraverso i dispositivi sintetici è stata ulteriormente confermata mediante l'analisi di sezioni longitudinali sottoposte a immunofluorescenza con S100 (rosso) e con il marcatore delle fibre nervose periferiche PGP9.5 (verde). Il condotto, ancora chiaramente riconoscibile, ha supportato la riconnessione strutturale tra il moncone prossimale e quello distale del nervo lesionato (Figura 10).

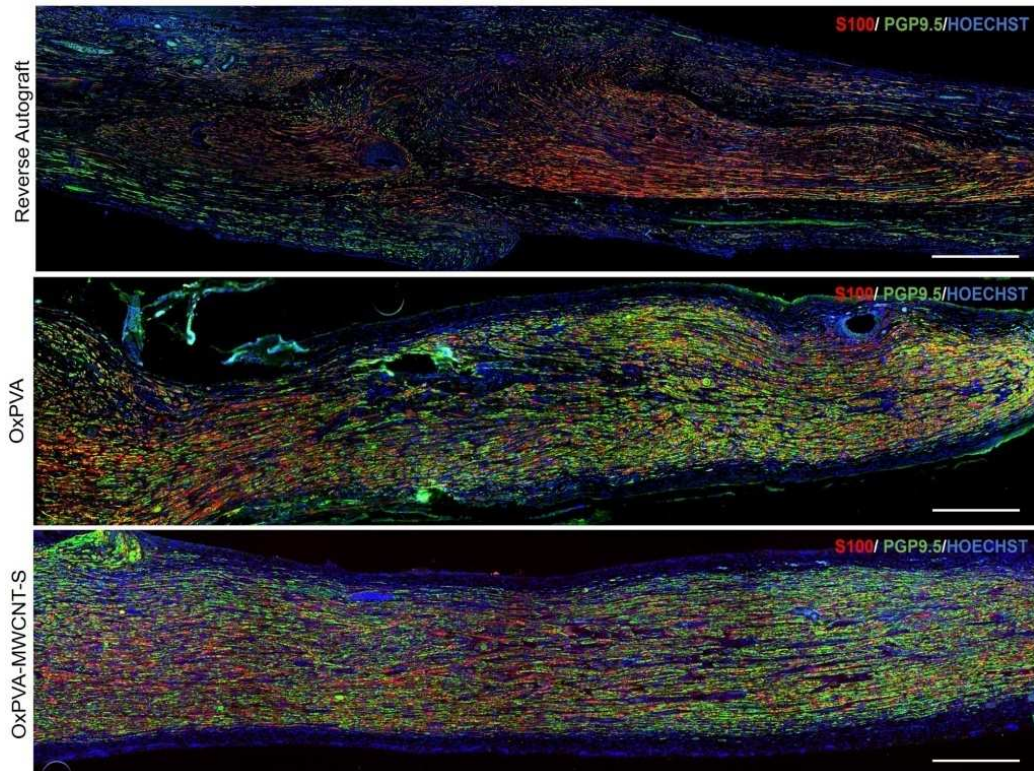


Figura 10. Analisi di immunofluorescenza della rigenerazione nervosa dopo 6 settimane dall'intervento chirurgico. Immagini rappresentative di sezioni longitudinali a lunghezza intera degli innesti/condotti espianati che mostrano assoni appena rigenerati. La doppia colorazione in immunofluorescenza mostra le cellule di Schwann (S100, rosso) e gli assoni (PGP9.5, verde). I nuclei cellulari sono colorati con Hoechst (blu). Scale bar: 500 μm .

3.7 Analisi morfometrica

L'analisi morfometrica è necessaria per confrontare i risultati associati all'impiego dei diversi device versus Reverse Autograft. Per quanto riguarda l'area totale della sezione trasversale (μm^2), quella del Reverse Autograft ($1\,4664\,490 \pm 22\,771.18$) è risultata essere la maggiore ($P < 0.0001$) tra quelle misurate nella coorte (OxPVA: $216\,776.1 \pm 25\,593.49$; OxPVA+MWCNT-S: $359\,149.1 \pm 14\,831.18$, $P < 0.001$) (Figura 11A). allo stesso modo, anche nell'area fascicolare (μm^2) il Reverse Autograft ha dimostrato un valore medio maggiore ($P < 0.0001$) ($740\,261.7 \pm 27\,60.72$) seguito da OxPVA+MWCNT-S ($286\,320.8 \pm 16\,690.29$) e OxPVA ($147\,745 \pm 24\,352.76$). È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa confrontando OxPVA+MWCNT-S e OxPVA ($P < 0.001$) (Figura 11C).

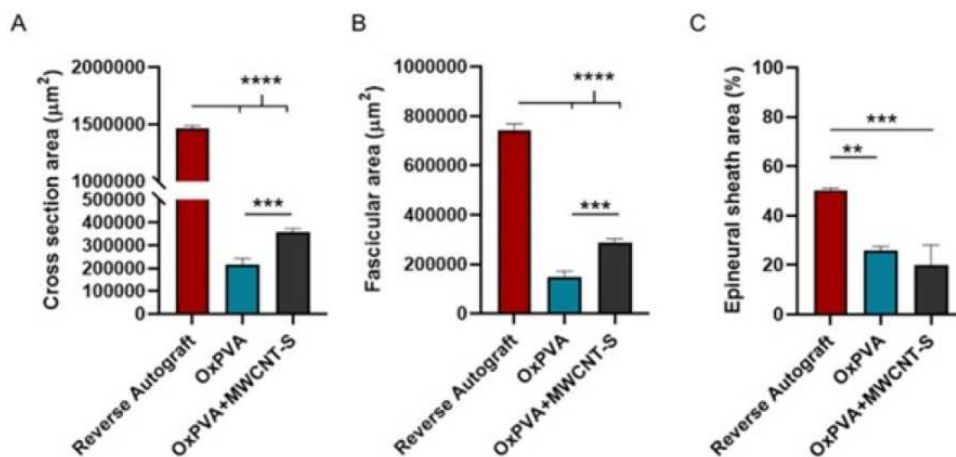


Figura 11. Analisi morfometrica della sezione trasversale centrale. Gli istogrammi mostrano l'area totale media della sezione trasversale del nervo (μm^2) (A), l'area fascicolare (μm^2) (B) e l'area della guaina epineurale (%) (C). ($P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

La mielinizzazione e la rigenerazione degli assoni sono state indagate mediante colorazione con blu di toluidina su sezione semifina e TEM (Figura 12A). Sono stati determinati il numero totale di assoni mielinizzati/nervo e la loro densità; quindi, sono stati determinati il diametro della fibra, dell'assone, lo spessore della mielina e il g-ratio, non solo per favorire una descrizione del tessuto rigenerato, ma anche per fornire dati importanti relativi al recupero funzionale. In relazione al numero totale di assoni mielinizzati/nervo (fascicolo nervoso), il Reverse Autograft ha mostrato il valore medio più alto ($14\,236.52 \pm 1940.13$) (OxPVA: 3249.30 ± 349.89 , $P < 0.001$; OxPVA+MWCNT-S: 6928.47 ± 1560.81 , $P < 0.01$). con una differenza significativa tra OxPVA+MWCNT-S e OxPVA ($P < 0.05$) (Figura 12B). Con riferimento alla densità degli assoni (assoni/ μm^2) (Figura 12C) l'ordine decrescente è risultato essere il seguente: Reverse Autograft (0.019745 ± 0.001188), OxPVA (0.020826 ± 0.002151), OxPVA+MWCNT-S (0.024198 ± 0.005451); senza differenze significative. Il diametro della fibra (μm) ha mostrato il seguente ordine: OxPVA (6.61 ± 0.30), Reverse Autograft (6.37 ± 0.62), OxPVA+MWCNT-S (4.44 ± 0.17), quest'ultimo con valori significativamente inferiori rispetto ai primi due gruppi ($P < 0.01$) (Figura 12D). La media del diametro degli assoni (μm) è stata calcolata per ogni gruppo: OxPVA, 4.48 ± 0.20 , Reverse Autograft, 4.21 ± 0.33 , OxPVA+MWCNT-S, 3.00 ± 0.17 , con differenze significative tra tutti i gruppi (Figura 12E). La guaina mielinica (μm) è stata misurata ed è stata riconoscibile una progressiva riduzione dello spessore nel seguente ordine: Reverse Autograft (1.01 ± 0.07), OxPVA (0.86 ± 0.04), OxPVA+MWCNT-S (0.74 ± 0.02), con differenze significative tra i gruppi (Figura 12F). La media dei g-ratio ha mostrato i seguenti valori: Reverse Autograft (0.65 ± 0.041); OxPVA (0.76 ± 0.05); OxPVA+MWCNT-S (0.65 ± 0.02); con differenze significative

tra l'OxPVA e gli altri due gruppi ($P < 0.05$) (Figura 12G). Per quanto riguarda la distribuzione/prevalenza degli intervalli di g-ratio (%), il range 0.6-0.7 è stato principalmente rappresentato nei gruppi Reverse Autograft e OxPVA+MWCNT-S (rispettivamente 39.47% e 46.81%), l'OxPVA ha mostrato principalmente l'intervallo 0.7-0.8 (69.31%) (Figura 12H-J).

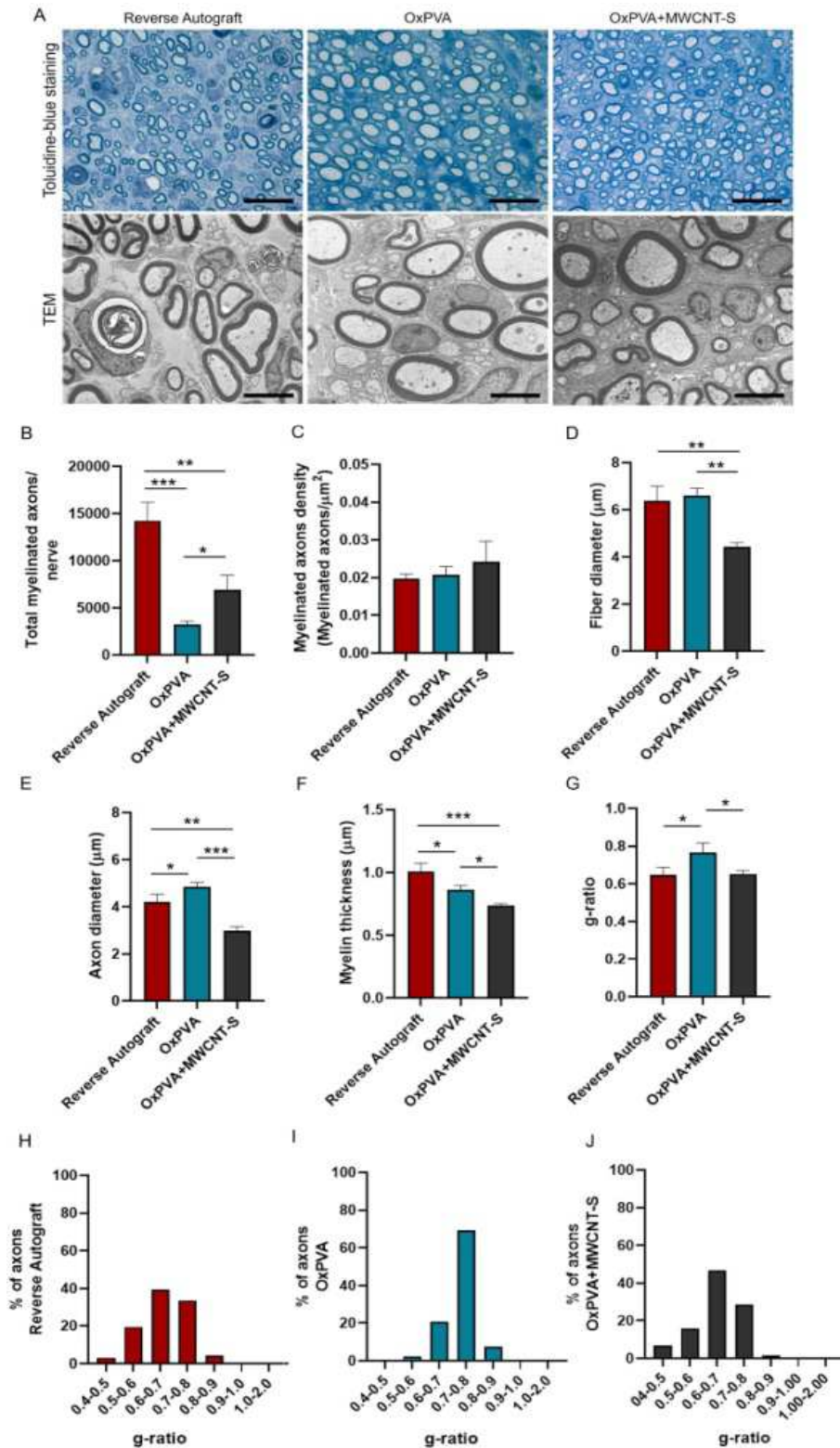


Figura 12. Analisi degli assoni mielinizzati, porzione intermedia. (A) Valutazione del tessuto rigenerato tramite colorazione con blu di toluidina e microscopia elettronica a trasmissione (TEM) (barra di scala: 20 μm (sezioni semisottili); 6 μm , immagini TEM). (B, C) Gli istogrammi mostrano il numero totale di assoni mielinizzati/nervo (B) e la densità degli assoni mielinizzati (numero di assoni/area fascicolare (μm^2)) (C). (D-F) Gli istogrammi mostrano il diametro medio della fibra (μm^2) (D), il diametro medio dell'assone (μm^2) (E), lo spessore medio della mielina (μm^2) (F). (G) Valori medi del g-ratio calcolati per ciascun gruppo sperimentale. (H-J) Valutazione della distribuzione dei valori del g-ratio e percentuale di prevalenza per ciascun gruppo sperimentale. I risultati sono riportati come valori medi $\pm$ DS (*P < 0,05; P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

3.8 Peso del muscolo gastrocnemio

L'atrofia del muscolo gastrocnemio, associata a una riduzione della massa muscolare, è una conseguenza comunemente osservata in seguito alla lesione o resezione del nervo sciatico. I dati raccolti, ottenuti confrontando il peso umido del muscolo dell'arto operato con quello dell'arto controlaterale sano, non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali. Tuttavia, i valori percentuali del rapporto tra il peso del muscolo operato e quello controlaterale hanno mostrato il seguente ordine decrescente: Reverse Autograft ($32.67 \pm 23.70\%$), OxPVA ($30.33 \pm 18.61\%$), OxPVA+MWCNT-S ($27.33 \pm 4.93\%$).

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

4.1 Discussione

In seguito ad una lesione del nervo periferico, il recupero della funzione dipende dalla crescita e dall'estensione degli assoni rigenerati, attraverso il sito lesionato, fino a raggiungere e re-innervare il sito target distale. Le evidenze sperimentali mostrano il posizionamento del condotto come un'alternativa promettente all'interposizione di autoinnesti. I dispositivi tubulari ricoprono un ruolo cruciale nel guidare la crescita degli assoni e nel fornire un microambiente adatto al rilascio/diffusione dei fattori neurotrofici prevenendo al contempo l'infiltrazione di tessuto fibroconnettivale che potrebbe ostacolare la rigenerazione stessa. In questo contesto, studi emergenti evidenziano il potenziale di nanomateriali nella rigenerazione nervosa periferica in quanto simulano un microambiente fisiologico, promuovendo così la crescita, il differenziamento e l'organizzazione spaziale dei neuroni. L'incorporazione dello 0.1% in peso di MWCNT-S all'interno della soluzione di OxPVA ha portato a idrogel reticolati con una certa conduttività superficiale (OxPVA+MWCNT-S: $1.81 \times 10^{-6} \pm 2.00 \times 10^{-7}$; OxPVA: $2.00 \times 10^{-10} \pm 9.16 \times 10^{-12}$); tuttavia, l'efficacia di tali dispositivi tubulari in un modello animale di lesione del nervo periferico non era ancora stata considerata. La rigenerazione del nervo periferico in seguito alla perdita di sostanza è un evento complesso che richiede l'azione combinata di diversi fattori e segnali per ristabilire il microambiente ideale. Gli attuali progressi nello sviluppo di condotti nervosi mirano a creare un ambiente interno che imiti quello naturale per garantire una migliore efficacia terapeutica. Una volta reticolati fisicamente, i condotti di OxPVA+MWCNT-S hanno confermato una certa nanoporosità in sezione e un'alterazione della superficie; questa organizzazione ultrastrutturale può avere un ruolo interessante nel promuovere l'adsorbimento delle proteine ECM che vengono rilasciate durante la rigenerazione incluso il plasma ricco di fattori neurotrofici e molecole precursori ECM (fibrinogeno e fattore XIII). La dimensione dei pori nell'OxPVA cambia con l'introduzione delle nano strutture e ciò può essere dovuto al metodo d'incorporazione meccanica dei MWCNT-S e alla loro interazione con le catene di OxPVA. Si può presumere che l'aumento di nanoporosità migliori ulteriormente le capacità dell'OxPVA di adsorbire e rilasciare molecole bioattive trasformando lo spazio luminale del condotto in una camera di rigenerazione per gli assoni. I condotti a base di OxPVA dimostrano di adattarsi bene ai monconi terminali dei nervi e di resistere alla sutura senza dare origine a rotture; inoltre, l'SRS dei condotti di OxPVA e OxPVA+MWCNT-S variava tra 0.23 e 0.27 e tra 0.12 e 0.23 rispettivamente, valori quindi paragonabili a valori di SRS

riportati per altri condotti nervosi in letteratura; in aggiunta, è da notare che l'incorporazione di MWCNT-S nell'idrogel di OxPVA non ha modificato in modo significativo l'SRS. Le proprietà meccaniche (trazione) dei due tipi di condotti sono analoghe. Dopo l'intervento chirurgico, il benessere degli animali è stato monitorato nel tempo e gli impianti in questo caso si sono dimostrati ben tollerati dall'intera coorte. Risultati funzionali specifici sono stati valutati mediante la determinazione dell'SFI. L'intera coorte è lontana da valori che potrebbero suggerire uno stato "normale"; verosimilmente ciò potrebbe essere ricondotto al momento precoce in cui è stata fatta la valutazione. Contestualmente i dati istologici e morfologici forniscono indicatori precoci di rigenerazione. Al momento dell'espanto, i nervi sono stati osservati in situ prima del prelievo. Gli idrogel risultavano ancora chiaramente identificabili nel sito di impianto, suggerendo l'idoneità dei dispositivi nel supportare il processo di rigenerazione nervosa. Inoltre, il profilo di degradazione dell'1% di OxPVA è risultato coerente con i requisiti richiesti per i condotti nervosi, che dovrebbero mantenere la propria integrità strutturale fino al completamento della rigenerazione del nervo e successivamente degradarsi in modo graduale, al fine di minimizzare il rischio di una risposta immunitaria cronica o di fenomeni di rigetto. Il tessuto rigenerato è stato valutato mediante analisi di immunoistochimica e di immunofluorescenza associate ad analisi morfostrutturali: è stata confermata la presenza di tessuto nervoso all'interno dei condotti. La formazione dell'epinevrio è stata ulteriormente confermata mediante colorazione Azan-Mallory su sezioni trasversali della porzione centrale del nervo rigenerato. Questa struttura connettivale svolge un ruolo fondamentale nel processo rigenerativo, favorendo la crescita assonale e fornendo proprietà angiogeniche essenziali per il supporto della rigenerazione nervosa. A seguito dell'impianto dei condotti OxPVA+MWCNT-S non sono stati osservati segni di infiammazione severa, né all'esame macroscopico né in seguito alle analisi istologiche. Tali risultati dimostrano l'elevata biocompatibilità dei condotti e la loro buona tollerabilità da parte degli animali dell'intera coorte sperimentale. Infine, è stato condotto uno studio morfometrico: il diametro della fibra e dell'assone e lo spessore della mielina sono fondamentali in quanto influenzano le velocità di conduzione dell'impulso nervoso; per quanto riguarda il g-ratio, il valore di 0.6 è associato ad una conduzione degli impulsi nervosi ottimale, mentre 0.4 può indicare fibre nervose degenerate e il valore di 0.7 può indicare fibre rigenerate con guaina mielinica sottile o fibre de-mielinizzate. Analizzando i risultati dello studio, sono stati riscontrati valori medi più elevati del diametro assonale, del diametro delle fibre nervose e dello spessore della guaina

mielinica nel gruppo OxPVA rispetto al gruppo OxPVA+MWCNT-S. Tuttavia, il numero totale di assoni mielinizzati per nervo e la densità assonale sono risultati maggiori nei campioni trattati con OxPVA+MWCNT-S rispetto a quelli trattati con OxPVA. Inoltre, l'analisi del g-ratio ha evidenziato un andamento simile nei gruppi OxPVA+MWCNT-S e Reverse Autograft, con la maggior parte delle fibre distribuita nell'intervallo compreso tra 0,6 e 0,7. Al contrario, nel gruppo OxPVA è stata osservata una prevalenza di fibre con g-ratio compreso tra 0,7 e 0,8.

Per completare ulteriormente questo studio e valutare in maniera più approfondita il recupero funzionale nel modello di lesione adottato, potrebbero essere integrate analisi elettrofisiologiche, dati ottenuti da periodi di impianto in vivo più prolungati e risultati relativi a un gruppo di controllo sham, al fine di consentire un confronto diretto con il tessuto nervoso nativo non lesionato. Nonostante tali limitazioni, l'inclusione del Reverse Autograft, considerato il gold standard e ampiamente utilizzato nella pratica clinica, fornisce un importante riferimento per la valutazione delle prestazioni rigenerative dei condotti OxPVA+MWCNT-S. Nel complesso, le evidenze sperimentali raccolte rappresentano un passo significativo verso lo sviluppo di condotti nervosi più efficaci per la rigenerazione dei nervi periferici, basati su idrogel funzionalizzati mediante l'incorporazione di nanomateriali elettroconduttivi.

4.2 Conclusioni

In questo studio, è stato esplorato e confermato il potenziale di un nuovo materiale nanocomposito ibrido per la produzione di NC, derivato dalla combinazione di idrogel di OxPVA con MWCNT-S. È interessante notare che l'incorporazione di MWCNT-S (0.1% in peso) all'interno della soluzione polimerica di OxPVA si è dimostrata efficace: era a basso dosaggio, omogenea e non ha influenzato/compromesso la resistenza meccanica del materiale reticolato. Inoltre, le evidenze dello studio preclinico, comprese le analisi istologiche, immunoistochimiche e di immunofluorescenza degli espianti, hanno mostrato che i NC composti hanno promosso la rigenerazione tissutale con cellule di Schwann, assoni e vasi sanguigni che sono stati tutti riconosciuti, senza segni di infiammazione. Questi risultati sono in accordo con precedenti evidenze in cui la presenza di MWCNT-S in OxPVA non è stata associata a citotossicità in vitro o segni locali di infiammazione dopo l'impianto sottocutaneo (14 e 42 giorni), dimostrando le biocompatibilità del materiale composito. Per quanto riguarda l'analisi morfometrica del nervo rigenerato, sono stati osservati valori inferiori in termini di area della sezione trasversale e area fascicolare dei condotti di OxPVA+MWNT-

S rispetto al gruppo Reverse Autograft, ma non rispetto al solo OxPVA. Il Reverse Autograft, non essendo un processo di rigenerazione de novo come i condotti, può spiegare il maggior numero di assoni mielinizzati osservato in questo gruppo. L'area dell'epinevrio è risultata più ampia nel Reverse Autograft, seguita da OxPVA e OxPVA+MWCNT-S, e il suo spessore riflette l'equilibrio tra rigenerazione assonale, infiammazione e rimodellamento della matrice extracellulare. La densità assonale più elevata è stata invece osservata nel gruppo OxPVA+MWCNT-S. Le analisi del g-ratio hanno mostrato una distribuzione simile tra OxPVA+MWCNT-S e Reverse Autograft. In prospettiva, saranno necessari studi su gap nervosi più estesi, follow-up a lungo termine e valutazioni elettrofisiologiche per una caratterizzazione più completa dell'efficacia funzionale e del potenziale clinico dei condotti.

5. Bibliografia

- [1](FitzGerald, Gruener, & Mtui, 2008)
- [2] Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. Clin Neurophysiol. 2008 Sep;119(9):1951-65. doi: 10.1016/j.clinph.2008.03.018. Epub 2008 May 14. PMID: 18482862
- [3] Modrak M, Talukder MAH, Gurgensashvili K, Noble M, Elfar JC. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. J Neurosci Res. 2020 May;98(5):780-795. doi: 10.1002/jnr.24538. Epub 2019 Oct 13. PMID: 31608497; PMCID: PMC7072007.
- [4] Stocco E, Barbon S, Emmi A, Tiengo C, Macchi V, De Caro R, Porzionato A. Bridging Gaps in Peripheral Nerves: From Current Strategies to Future Perspectives in Conduit Design. Int J Mol Sci. 2023 May 24;24(11):9170. doi: 10.3390/ijms24119170. PMID: 37298122; PMCID: PMC10252835.
- [5] Klimovich P, Rubina K, Sysoeva V, Semina E. New Frontiers in Peripheral Nerve Regeneration: Concerns and Remedies. Int J Mol Sci. 2021 Dec 13;22(24):13380. doi: 10.3390/ijms222413380. PMID: 34948176; PMCID: PMC8703705.

6. Appendice

Stocco E, Barbon S, Confalonieri M, Petrelli L, D'Ossualdo A, Ceroni L, Benazzato S, Contran M, Emmi A, Tiengo C, De Caro R, Macchi V, Todros S, Pavan PG, Menna E, Porzionato A. Hybrid nanocomposite conduit based on oxidized polyvinyl alcohol and multiwalled carbon nanotubes: a new device supporting peripheral nerve regeneration in animal model of disease. *Regen Biomater.* 2025 Nov 12;12:rbaf108. doi: 10.1093/rb/rbaf108. PMID: 41427423; PMCID: PMC12714389

Hybrid nanocomposite conduit based on oxidized polyvinyl alcohol and multiwalled carbon nanotubes: a new device supporting peripheral nerve regeneration in animal model of disease

Elena Stocco^{1,2,3,4,*}, Silvia Barbon^{1,4,*}, Marta Confalonieri^{1,5}, Lucia Petrelli¹, Alice D'Ossualdo¹, Ludovica Ceroni⁶, Stefania Benazzato⁶, Martina Contran¹, Aron Emmi¹, Cesare Tiengo⁷, Raffaele De Caro¹, Veronica Macchi^{1,*}, Silvia Todros⁵, Piero G. Pavan⁵, Enzo Menna⁶ and Andrea Porzionato¹

¹Section of Human Anatomy, Department of Neuroscience, University of Padova, Padova, 35121, Italy

²Department of Women's and Children's Health, University of Padova, Padova, 35128, Italy

³Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padova, Padova, 35122, Italy

⁴Foundation for Biology and Regenerative Medicine, Tissue Engineering and Signaling-TES, Onlus, Padova, 35121, Italy

⁵Department of Industrial Engineering, University of Padova, Padova, 35131, Italy

⁶Department of Chemical Sciences, University of Padova & INSTM, Padova, 35131, Italy

⁷Plastic and Reconstructive Surgery Unit, Department of Neuroscience, University of Padova, Padova, 35121, Italy

*Correspondence address. E-mail: silvia.barbon@unipd.it (S.B.); elena.stocco@unipd.it (E.S.); veronica.macchi@unipd.it (V.M.)

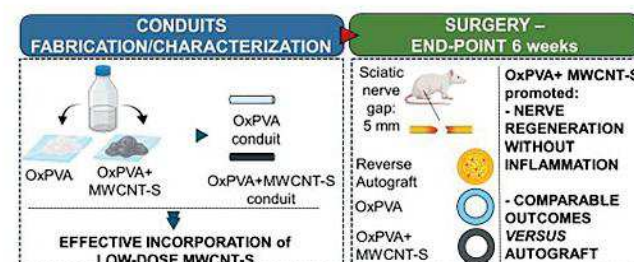
Abstract

Severe peripheral nerve injuries represent a significant clinical problem, and intense efforts are dedicated toward the identification of the 'ideal' nerve conduit (NC). In this context, incorporating electrical cues within the device wall seems to be extremely appealing. Here, a new NC based on the new polymer oxidized polyvinyl alcohol (OxPVA) (oxidation degree 1%) + water-soluble multiwalled carbon nanotubes (MWCNT-S) (0.1 wt% in OxPVA) was developed and characterized for ultrastructure and mechanical behavior. Subsequently, OxPVA+MWCNT-S NCs were implanted in animal model of disease (Sprague–Dawley rat; sciatic nerve, gap: 5 mm) and compared with OxPVA and Reverse Autograft. Following sciatic functional index evaluation, implants-associated outcomes were verified on explants through histology, immunohistochemistry, immunofluorescence and morphometric studies on semithin sections, after 6 weeks from surgery. According to preclinical study evidence, all the NCs supported nerve regeneration (S100/β-tubulin/neurofilaments) without severe inflammatory reaction (CD3/F4/80). Morphometric studies showed the highest cross-section area and fascicular area for Reverse Autograft followed by OxPVA+MWCNT-S and OxPVA. The epineurium thickness was the highest in Reverse Autograft followed by OxPVA and OxPVA+MWCNT-S. Myelinated axon density was highest for OxPVA+MWCNT-S, followed by OxPVA and Reverse Autograft; myelinated axons total number followed this descending order Reverse Autograft>OxPVA+MWCNT-S>OxPVA. Additionally, the g-ratio distribution highlighted a similar trend for OxPVA+MWCNT-S and Reverse Autograft with most nerve fibers within the 0.6–0.7 interval. Atrophy of the operated-limb gastrocnemius was comparable in the whole cohort. Interestingly, MWCNT-S incorporation in OxPVA showed to be an appealing strategy to improve the morpho-structural outcomes associated with these devices.

Keywords: oxidized polyvinyl alcohol; carbon nanotubes; nerve conduits; peripheral nerve injuries; nerve regeneration

Introduction

In the field of peripheral nerve injury repair, intense bioengineering research is devoted toward identification of devices able to guarantee for successful outcomes in case of neurotmesis, the most critical surgical scenario associated with a complete interruption of the nerve continuity, complete loss of function and limited axonal regrowth. Currently, when direct end-to-end repair is not feasible, autograft placement remains the gold-standard treatment option. However,



the risk of donor-site morbidity and dimensional mismatch between donor and recipient nerves have further driven research into off-the-shelf alternatives. Among the eleven Food and Drug Administration-approved NCs [1, 2], none stands out for the *in vivo* outcomes. Synthetic bioresorbable NCs may lead to an immune response, scar tissue formation and release of by-products that are detrimental for the regeneration process. Non-biodegradable NCs require a second surgery for their removal, with further disadvantage [3]. Within this

Received: 24 July 2025. Revised: 08 September 2025. Accepted: 01 October 2025

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

scenario, many materials, differently improved, have been investigated to ameliorate NCs performances. The main challenge consists in creating conduits with the appropriate chemical, physical and structural properties to withstand the mechanical stresses experienced in the body and to remain functional during critical stages of nerve healing and recovery [4].

Experimental evidence highlights that promoting the electrical conductivity of devices for peripheral nerve regeneration enhances the potential for nerve regrowth and remyelination with complete lesion recovery. This is consequence of improved electrostatic cell-cell and cell-scaffold interactions [5, 6]. Among the conductive materials used for artificial NCs fabrication are encountered: polypyrrole (PPy), polyaniline (PAni) and polythiophene (PTh); however, their rigid structure obstacles their performance [7]. Along with conductive polymers, carbon nanotubes (CNTs), in either a single-wall (SWCNT) or multi-wall (MWCNT) configuration, have a wide range of applications in bioengineering, including the development of NCs. In this context, they have demonstrated the ability to support sustainable neuronal survival and promote neuronal outgrowth [8–12]. Specifically, they are recognized as interesting nanoscale candidates for incorporation into polymeric networks, thus leading to nanocomposite materials [13]. However, because of their poor dispersion in aqueous medium or other solvents, tailored chemical modifications of CNT structures are necessary to prevent aggregation and potential toxicity issues, while preserving their ability to promote neuronal differentiation.

Among polymers with appealing characteristics for tissue engineering purposes, our partially oxidized polyvinyl alcohol (OxPVA) revealed as a captivating biomaterial [14–16] also for the development of biodegradable nerve conduits/wraps [17–21] eventually functionalized by growth factors adsorption (nerve growth factor (NGF); Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) with/without the transactivator transduction domain (TAT)) or by self-assembling peptides mechanical incorporation (EAK; EAK-YIGSR) [2, 17, 20, 22]. Additionally, new OxPVA composites with water-soluble MWCNTs (OxPVA+MWCNT-S) were also fabricated and characterized [23–25]; however, no evidence was provided about their ability in promoting nerve regeneration *in vivo*.

In the present experimental work, it was investigated the effect of OxPVA+MWCNT-S NCs in nerve regeneration after neurotmesis (animal model: Sprague–Dawley rats, sciatic nerve injury, gap: 5 mm). OxPVA conduits free from MWCNT-S and Reverse Autograft were used as control groups. Study evidence confirmed that mechanical incorporation of cues within OxPVA is a simple and effective method for polymer customization. Moreover, OxPVA activation by MWCNT-S showed to improve the hydrogel performances with appealing outcomes *in vivo*.

Materials and methods

Preparation of OxPVA

The OxPVA was prepared according to a well-established protocol, as described by Stocco *et al.* [15]. A weighed amount of PVA powder [molecular weight (Mw) 146 000–186 000 Da, 99+% hydrolyzed] was suspended in MilliQ water and solubilized. Hence, partial oxidation was performed by adding an acidic potassium permanganate (KMnO₄) solution. Oxidized polymer solution underwent extensive dialysis (8000 Da cut-off (Sigma-Aldrich)); then, it was frozen at –20°C overnight and lyophilized (Speed Vac Concentrator Savant, Instruments Inc., Farmingdale, NJ, USA) for long-term storage. For polymer recovery, 16 weight (wt) % OxPVA

was weighed, suspended into MilliQ water and heated in boiling bath.

MWCNT functionalization

MWCNT (ACS Material LLC, OD: <8 nm, SKU# CMP00105) were functionalized according to a previously reported procedure [25] here summarized. MWCNT (50 mg, 4.16 mmol of C) were dispersed in an aqueous solution of sodium sulfanilate dihydrate (48.1 mg, 0.05 eq/mol C) (99%, Sigma-Aldrich). Then, isopentyl nitrite (58 µL, 0.1 eq/mol C) (96%, Sigma-Aldrich) was added and the reaction proceeded for 4 h at 80°C under N₂ flux. The product was recovered by filtration and washed with water and methanol.

Nerve conduits fabrication

Three grams of the OxPVA hydrogel were combined with MWCNT-S suspension (0.1 wt% in OxPVA). The homogeneous distribution of the MWCNTs within the polymer matrix was achieved by mechanical embedding. Subsequently, the NCs were fabricated by cast-moulding method, aspirating the OxPVA+MWCNT-S into a tubular stainless mold (length: 5 cm; internal diameter: 2.1 mm) equipped with a central coaxial mandrel (diameter: 1.2 mm). Thereafter, the system underwent to six freeze-thawing (FT) cycles (one cycle: freezing (at –20°C for 6 h)/thawing (at 22°C for 1 h)) leading to polymer physical cross-linking and NCs set-up. The NCs were stored at –20°C until use.

The same procedure was carried out to obtain OxPVA scaffolds (MWCNT-S-free) used as controls.

Nerve conduits characterization

Macroscopic appearance and ultrastructure

OxPVA and OxPVA+MWCNT-S NCs were compared for their gross appearance to detect differences ascribable to MWCNT-S presence within the OxPVA matrix. The samples were then processed for scanning electron microscopy (SEM) analysis to characterize their ultrastructure. Briefly, nerve conduits were cut in ~0.5 mm long segments and fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.2 M phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4, 24 h). Thus, the samples were dehydrated with a graded ethanol series, exposed to critical-point drying and gold sputtering and finally observed by a SEM system JSM-6490 (Jeol USA, Peabody, MA, USA).

The spatial distribution of MWCNT-S inside the OxPVA was evaluated by transmission electron microscopy (TEM) according to the following procedure: the OxPVA+MWCNT-S samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde (EMS; Cat. No. 16220) in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.4 ON at 4°C. Subsequently, the samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1M sodium cacodylate buffer for 1 hour at 4°C. After washing three times with water, samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in an epoxy resin (Sigma-Aldrich 46345). Ultrathin sections (60–70 nm) were obtained with a Leica Ultracut EM UC7 ultramicrotome, counterstained with uranyl acetate and lead citrate and viewed with a Tecnai G2 (FEI) transmission electron microscope operating at 100 kV. Images were captured with a Veleta (Olympus Soft Imaging System) digital camera.

Suture retention tests

The resistance to suture pull-out of OxPVA and OxPVA+MWCNT-S hydrogels was tested with suture retention (SR) test (five samples/experimental group) using the Bose ElectroForce® Planar Biaxial Test Bench instrument (TA Instruments, New Castle, USA) in uniaxial tensile mode. After cross-linking, the OxPVA and OxPVA+MWCNT-S hydrogels membranes were cut into rectangular samples (34×8×0.6 mm). The sample thickness was selected to

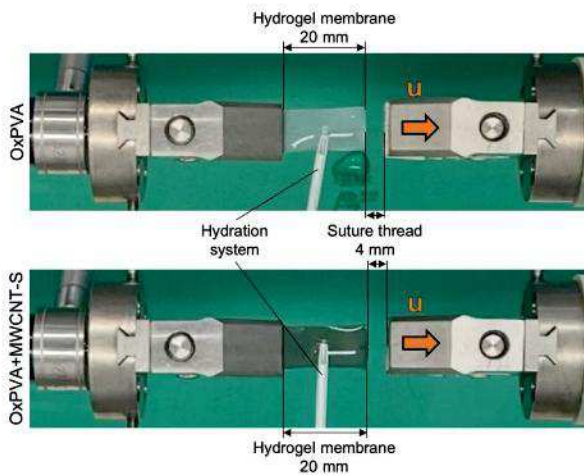


Figure 1. Suture retention test set-up. The initial gauge length is 24 mm (20 mm hydrogel membrane, 4 mm suture thread). Hydration of the sample was ensured by means of a drop-by-drop release of PBS solution. A displacement (u) of 24 mm is imposed at 0.12 mm s^{-1} .

be the same as the nerve conduit wall thickness, while the sample geometry was simplified for these tests only. The specimens were then sutured using Nylon 9-0 sutures; the thread was fixed to the grip and the opposite sample edge was clamped. The initial gauge length was equal to 24 mm, including 20 mm of hydrogel membrane and 4 mm of suture thread (Figure 1). All SR tests were performed in quasi-static condition, with elongation rate of 0.12 mm s^{-1} up to suture pull-out, in hydrated conditions. Suture Retention Strength (SRS) was determined from each test as the maximum force value reached during the suture pull-out.

Nerve conduits implantation in animal model of peripheral nerve injury

All animal procedures were approved by the ethical committee of Padua University, in agreement with the Italian Department of Health guidelines (Authorization n. 837/2019-PR, 9 December, 2019).

Fifteen adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into three experimental groups ($n=5$ /each): Reverse Autograft, OxPVA and OxPVA+MWCNT-S. Briefly, the animals were anaesthetized with gas mixture of isoflurane/oxygen; thus, the left sciatic nerve was exposed and medially transected, leaving a gap of 5 mm which was surgically treated with the positioning of Reverse Autograft or conduits. Regarding the Reverse Autograft group, the flipped sciatic nerve segment (5 mm in length) was reimplanted using Nylon 9-0 sutures; as for the conduits (10 mm in length), they were coaxially interposed between the proximal and the distal stumps and sutured to the epineurium with Nylon 9-0 sutures. The incision was closed with silk sutures (4-0). After surgery, the animals were allowed to recover in the cage; over the next five days, they were given appropriate anti-inflammatory and antibiotic therapy (Rimadyl® and Baytril®, respectively). The operated rats were housed in an adequate environment with a temperature-controlled facility, fed with laboratory rodent diet and given water *ad libitum*. Euthanasia was performed using carbon dioxide asphyxiation at the experimental endpoint of 6 weeks post-surgery. Initially, the implants were evaluated *in situ* for any potential ruptures and assessed for integrity, as well as the presence of any inflammatory signs. Subsequently, the implants were isolated/dissected and differently processed for subsequent analyses. Two samples/group were properly fixed for histological/immunohistochemical

analyses/immunofluorescence study; whereas, three samples/group were processed for semithin sections preparation, morphometric study and TEM analysis. Additionally, the gastrocnemius muscles of the operated limbs were also considered for comparison, focusing on weight analysis.

Animals' wellbeing and functional recovery

Animals' weight

To assess animals' wellbeing, their weight was recorded at Day 0, Day 20 and Day 42 from surgery to highlight eventual weight loss amenable to pain symptoms associated with surgery.

Sciatic functional index assessment

The attribution of the sciatic functional index (SFI) score was adopted to evaluate the motor recovery of the operated sciatic nerve at six weeks from surgery. As previously described, the rats were placed in a hallway previously lined with white paper; thus, the animals were allowed to walk along it once their hind legs had been stained with black ink. The SFI was determined according to Bain *et al.* [26] formula considering the footprints of both the normal and operated paws. Score around 0 is associated with normal nerve function; score around -100 is associated with total motor sciatic nerve dysfunction.

Nerve conduits retrieval and surgical site analysis

At the experimental endpoint (6 weeks from surgery) euthanasia was administered. The implants were first considered *in situ* for presence of inflammation-related signs eventually associated with perineural adhesions. Thereafter, adhesions were scored according to Petersen *et al.* [27]. Briefly, grade 1: 'Minimal adhesion that did not require dissection or that required minimal dissection'; grade 2: 'Moderate adhesions that required some vigorous blunt dissection but without sharp tools'; grade 3: 'Significant adhesions that required sharp dissection'.

Histological characterization of the regenerated tissue

Once harvested, $n=2$ samples/group were fixed in 10% (wt/v) formalin in PBS; hence, the central portion of the specimens was isolated, paraffin-embedded and sectioned (4- μm -thick serial transversal sections). Overall appearance and presence of fibro-connective tissue were analyzed by hematoxylin and eosin (H&E) and Azan Mallory, respectively.

Immunohistochemistry

The central portions of the samples in cross-section were immunostained using the following antibodies: anti-CD3 (polyclonal rabbit anti-human CD3, A 0452; Dako®, Milan, Italy, diluted 1:500) and anti-F4/80 (polyclonal rabbit anti-mouse, sc-26643-R; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, diluted 1:800) to highlight lympho-macrophagic infiltration; anti-S100 (polyclonal rabbit anti-S100, Z 0311; Dako®, diluted 1:5000) to identify Schwann cells; anti- β -tubulin (polyclonal rabbit neuronal class III β -tubulin, PRB-435P; Covance, Princeton, NJ, USA, diluted 1:1000) and anti-neurofilament heavy chain (NEFH) antibodies (rabbit recombinant monoclonal neurofilament heavy polypeptide antibody, ab207176; Abcam, Cambridge, UK, diluted 1:1000) to confirm the presence of axons. Except for S-100, antigen unmasking was done (10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, at 90°C for 10 min); sections were first incubated in blocking serum [0.04% (wt/v) bovine serum albumin (BSA; A2153, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) and 0.5% (wt/v) normal goat serum (X0907, Dako®)] to assure unspecific binding removal (30 min at room temperature, RT) and then with the above primary antibodies (1 h at RT). Primary

antibody binding was revealed by incubation with anti-rabbit/mouse serum diluted 1:100 in blocking serum (30 min at RT) (Dako® EnVision + TM peroxidase, rabbit/mouse; Dako®, Glostrup, Denmark) and developed in 3,3-diaminobenzidine (3 min at RT). Finally, hematoxylin was adopted for counterstaining. As a negative control, incubation without primary antibodies was performed.

Immunofluorescence

The quality of the regenerated tissue was verified on longitudinal nerve sections through immunofluorescence (IF). To this purpose, S100 (polyclonal rabbit anti-S100; Z 0311; Dako®, diluted 1:3000), and PGP9.5 (polyclonal mouse anti-PGP9.5; Dako®, diluted 1:300) markers were used. Once unmasked (10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, at 95°C for 10 min), the samples were dipped in quenching solution (133.76 mg of NH_4Cl in 50 ml dH_2O for 10 min at RT) to reduce native molecules' background fluorescence. Therefore, after PBS washing, samples were first treated with permeabilization and blocking solution (15% vol/vol Goat Serum, 2% wt/vol BSA, 0.25% wt/vol gelatin, 0.2% wt/vol glycine in PBS) containing 0.5% Triton X-100 (1 h at RT) and then incubated with the primary antibodies (overnight at 4°C). Alexa-Fluor plus 568 anti-Rabbit secondary antibody (A11011) (red) and Alexa-Fluor plus 488 Goat anti-Mouse secondary antibody (A32723) (green) were diluted 1:200 in 5% BSA + 0.05% Triton-X solution (30 min at RT) and incubated for 1 h at RT. Hoechst (Invitrogen, dilution: 1:10 000 in PBS) was used to stain the nuclei in blue. The positive signals were detected and acquired with a Leica, SP5 Laser Scanning Confocal Microscope.

Morphometric study

The regenerative outcome associated with the different implants was verified through a morphometric study. In accordance with a previously reported method [18], $n = 3$ samples/group were preliminarily fixed in 2.5% (wt/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS, divided in four different segments and post-fixed in 1% osmium tetroxide (Agar Scientific Elektron Technology, UK) in 0.1 M phosphate buffer. After dehydration in a graded alcohol series, the samples underwent epoxy resin embedding; semi-thin sections (0.5 μm) were cut through an ultramicrotome RMC-PTX PowerTome (Boeckeler Instruments, AZ, USA) and then stained with 1% toluidine blue. Images, acquired with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems Wetzlar, Germany), were considered for the

morphometric study. Specifically, central transversal sections were compared for: mean total cross-section area [μm^2], fascicular area [μm^2] and epineural sheath area (%) ([total cross-section area – fascicular area] $\times 100$). Contextually, five random quadrants from the fascicular area were selected and three high-power fields (7523 μm^2 /quadrant) were focused to calculate total myelinated axons number, average myelinated axons density (axons/ μm^2) and g-ratio (axon diameter/fiber diameter). ImageJ software was used for measurements.

Additionally, ultrathin sections (60 nm) were also collected on 300-mesh copper grids, counterstained with 2% (wt/v) uranyl acetate and then with Sato's lead prior to be observed by a Hitachi H-300 Transmission Electron Microscope (TEM).

Gastrocnemius muscle analysis

Both sides gastrocnemius muscles were carefully dissected, and their wet weights (g) were recorded with an electronic balance. Left gastrocnemius weight was expressed as a percentage of contralateral control.

Statistical analysis

Results are presented as the mean $\pm$ SD of at least three replicates for each experiment. Statistical analysis was conducted using Prism software (version 9.3.1, GraphPad Software, San Diego, USA). Differences between experimental groups were analyzed using both parametric and non-parametric statistical methods. One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test was used for normally distributed data, while the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test was applied for non-normally distributed data. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

SRS values of OxPVA and OxPVA+MWCNT-S hydrogels were analyzed through a non-parametric Mann–Withney U test, considering a significant P-values lower than 0.05. Statistical analyses were carried out by means of MATLAB (version: 9.14.0 (R2023a), Natick, Massachusetts).

Results

Distribution of MWCNT-S in OxPVA

TEM analysis was performed on OxPVA and OxPVA+ MWCNT-S samples to evaluate the spatial distribution of MWCNT-S within the polymer matrix. From the images, MWCNT-S appear rather uniformly distributed as individual tubes (Figure 2). This

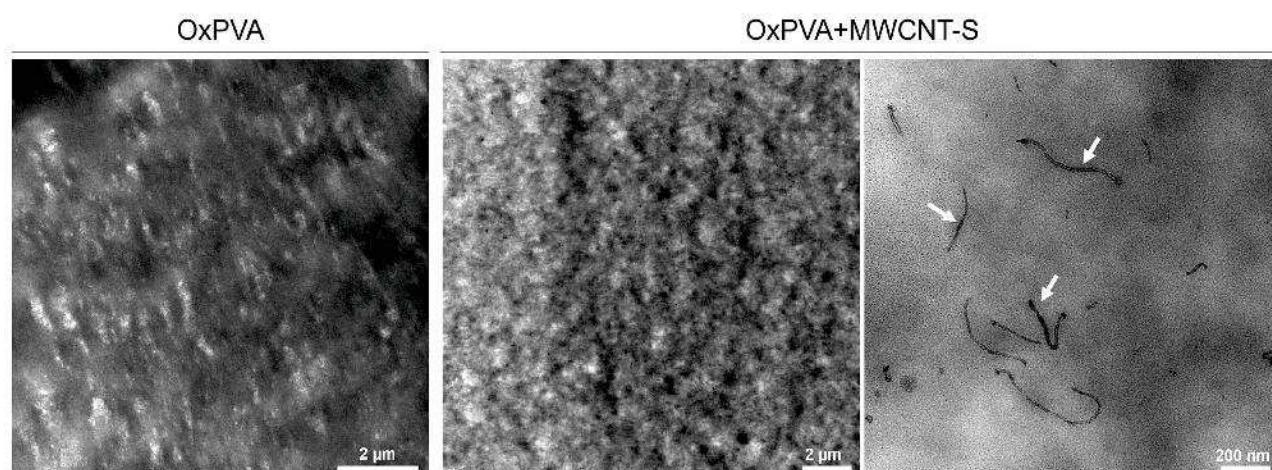


Figure 2. TEM images of OxPVA and OxPVA+ MWCNT-S samples acquired at different magnifications. White arrows show MWCNT-S within the polymer matrix. Scale bars: 2 μm ; 200 nm.

evidence provides further proof that our functionalization approach prevents CNT aggregation not only in solution, but also in the solid matrix, thus enhancing potential effects of the filler on the physical properties of the nanocomposite, as already shown in similar cases [28]. Indeed, when CNTs are present as individual tubes rather than aggregates, the interfacial area between filler and matrix is highly enhanced and a much lower loading is required to reach a conduction percolative network.

Nerve conduits appearance

The overall characteristics of the devices were initially assessed through comparison of their macroscopic appearance and ultrastructure. Following FT and once extruded from the mold, the devices appeared manipulable while maintaining their patency. The presence of MWCNT-S imparted a distinct dark color to the composite NCs; no CNT agglomeration areas, typically appearing as darker spots, were detected, suggesting nanostructures homogeneous dispersion within the polymer matrix. At SEM analysis, OxPVA conduits displayed a smooth outer surface and cross-section, whereas MWCNT-S imparted certain irregularities in the outer wall together with nanopores in section (Figure 3).

Suture retention strength

The results of SRS on OxPVA and OxPVA+MWCNT-S membranes are shown in Figure 4. These tests allowed to identify a range of SRS between 0.23 and 0.27 N for OxPVA, and between 0.12 and 0.23 N for OxPVA+MWCNT-S. No statistical difference was detected between the SRS of the two experimental groups (P -values >0.05).

Surgical repair of injured sciatic nerve

The OxPVA conduits demonstrated satisfactory performance once placed *in situ*, fitting well with the nerve ends. Additionally, no ruptures occurred during suturing, and no conduit kinking was observed. The same was verified for the composite devices,

OxPVA+MWCNT-S. Certainly, the transparent appearance of OxPVA conduits favored their placement *in vivo*; the stumps correct positioning was perceivable for OxPVA+MWCNT-S devices (Figure 5).

Behavioral response to implants and functional recovery assessment

Animals' wellbeing evaluation is an important index to determine surgery toleration and weight is a fundamental indicator of animals' overall health. Weight monitoring from Day 0 up to Day 42 showed no significant variation within the cohort (Figure 6A).

Nerve function recovery was assessed by the SFI score attribution. At 6 weeks, the SFI measured values were -78.70 ± 10.30 for Reverse Autograft; -79.52 ± 9.73 for OxPVA and -82.20 ± 12.48 for OxPVA+MWCNT-S (Figure 6B).

Evaluation of retrieved samples

Following euthanasia and sciatic nerve exposure, the implants were observed *in situ*. According to the adhesions' score, adhesences at the implants were graded as 2 for the whole cohort. Following the thin connective sheath removal, the conduits appeared as well integrated with the nerve, proving the excellent ability of the devices to be stable once positioned in a high mobile region like that of the sciatic nerve; furtherly, the overhangs of the conduits well supported the suture to the nerve stump's epineurium without dislocation signs. Neither scar tissue nor neuroma were detected.

Once excised, the NCs all showed a regenerated tissue inside that was macroscopically identifiable also through the black walls of the OxPVA+MWCNT-S conduits. Explants examination by H&E confirmed this evidence; in parallel, Azan Mallory staining highlighted the presence of connective tissue (i.e. collagen fibers, blue-stained) forming both the epineurium and an initial septal organization inside the newly regenerated tissue, likely suggesting the tissue organization in fascicles. Histological

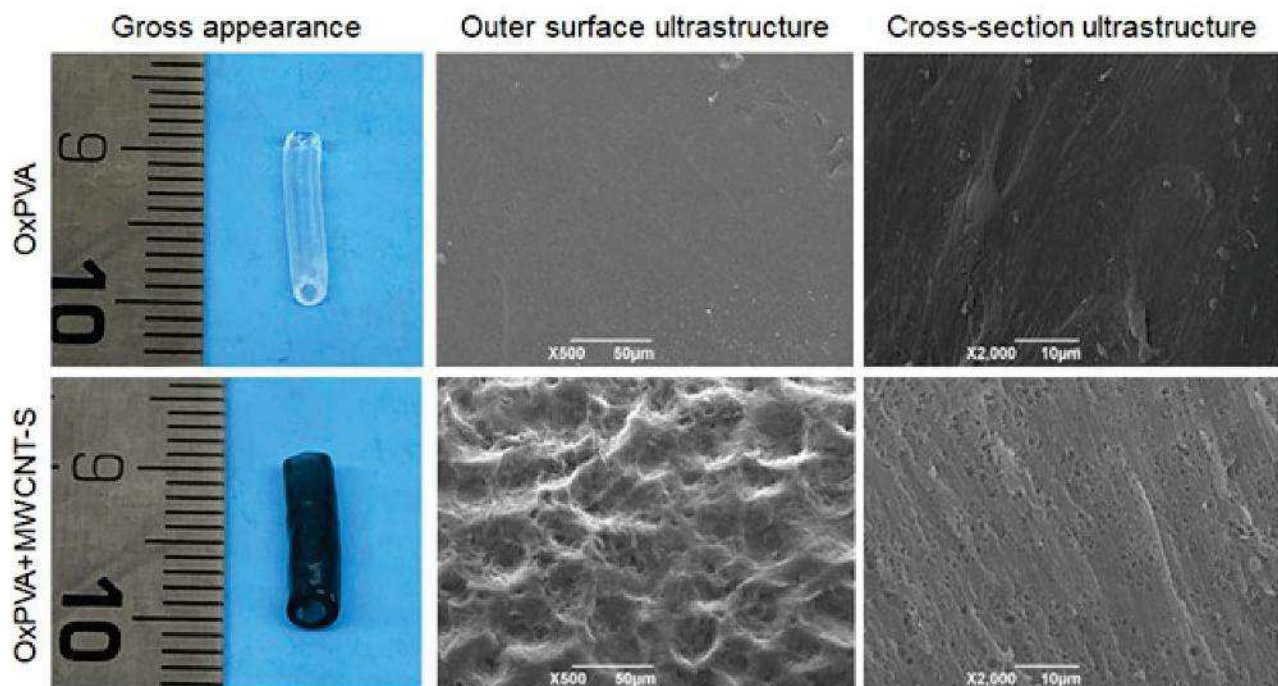


Figure 3. OxPVA and OxPVA+MWCNT-S nerve conduits gross appearance and ultrastructure referring to both the outer surface (scale bar: 50µm) and the cross-section (scale bar: 100µm).

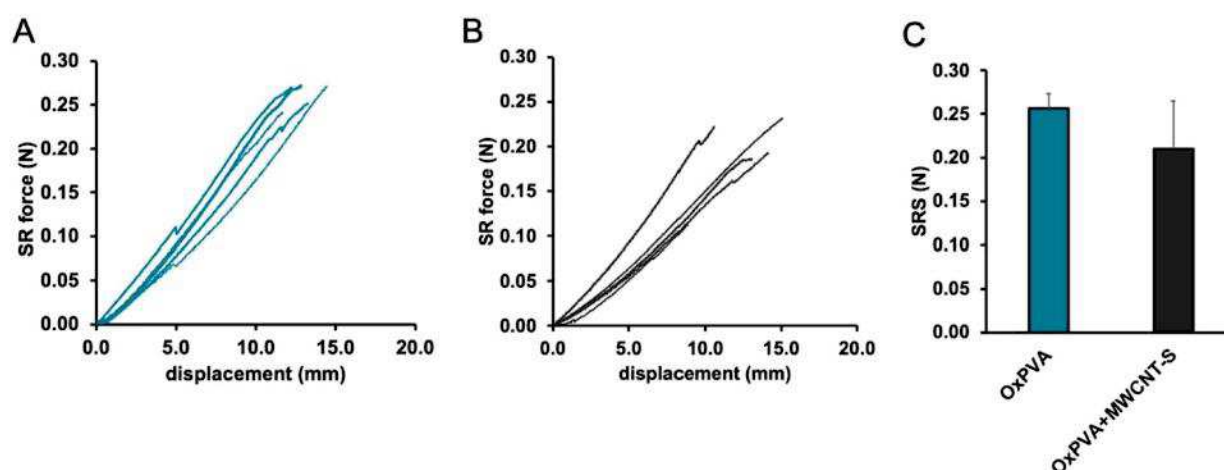


Figure 4. Suture retention force vs displacement of OxPVA (A) and OxPVA+MWCNT-S (B) up to suture pull-out. Comparison of suture retention strength values ($\pm$ SD) for OxPVA and OxPVA+MWCNT-S (C).

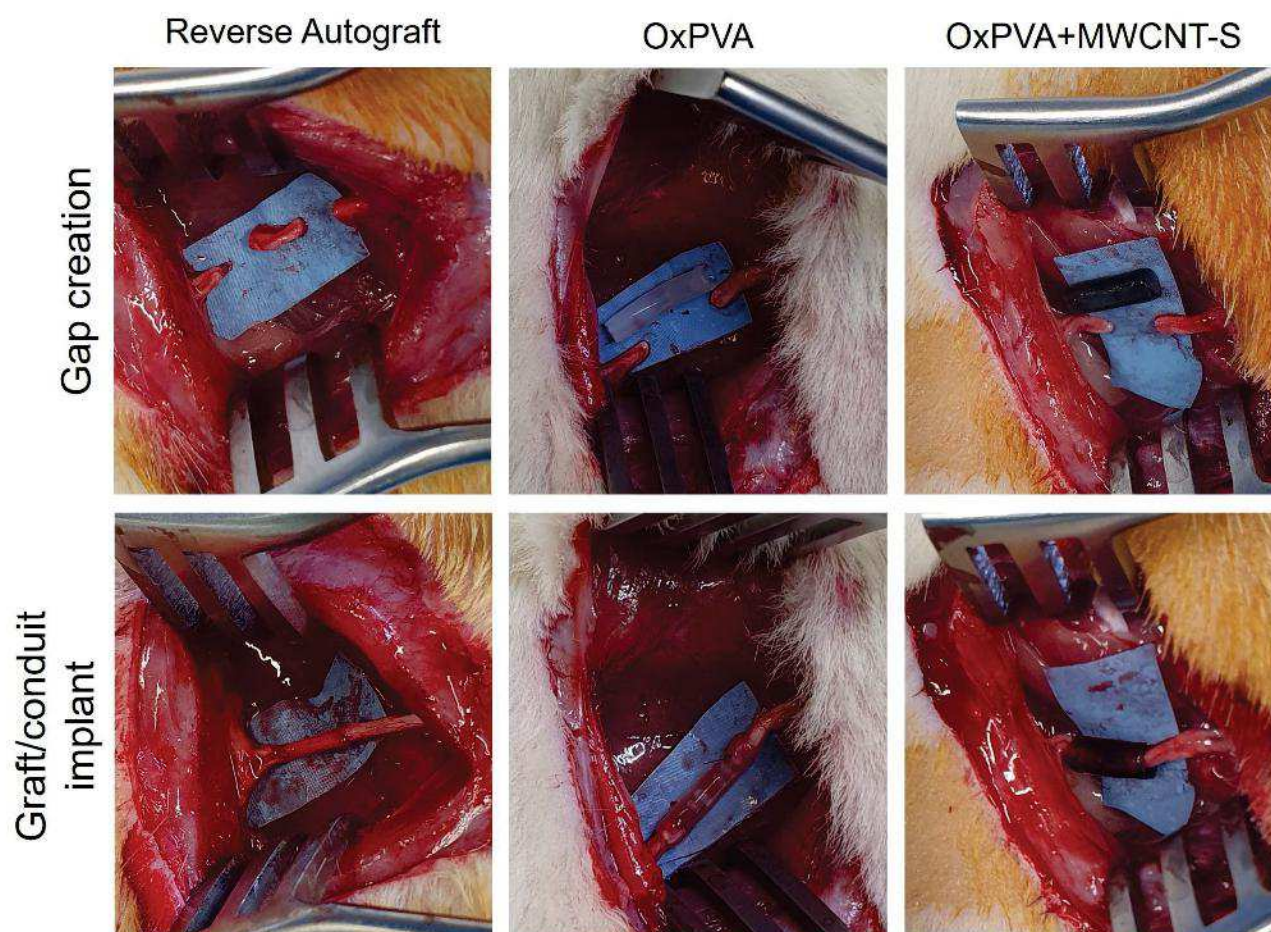


Figure 5. Reverse autograft, OxPVA and OxPVA+MWCNT-S nerve conduits implantation in Sprague-Dawley rat sciatic nerve lesion model (gap: 5 mm).

analysis showed Reverse Autograft overall appearance, exhibiting three fasci separated by fibro-connective tissue (Figure 7).

In accordance with immunohistochemistry-based evidence, only few CD3 and F4/80 immunopositive elements were detected inside NCs. Regarding the Reverse Autograft group, lymphocytes and macrophages were scant and mainly identifiable in correspondence of vessels (Figure 8).

Central portions all showed a manifested immunoreactivity for the Schwann cells marker S100 and for the axonal markers β III-tubulin and NEFH. Additionally, immunostaining for the endothelial cell marker protein CD31 allowed for detection of some positive elements too (Figure 9).

Nerve regeneration through the synthetic devices was further evidenced by longitudinal sections immunostained with

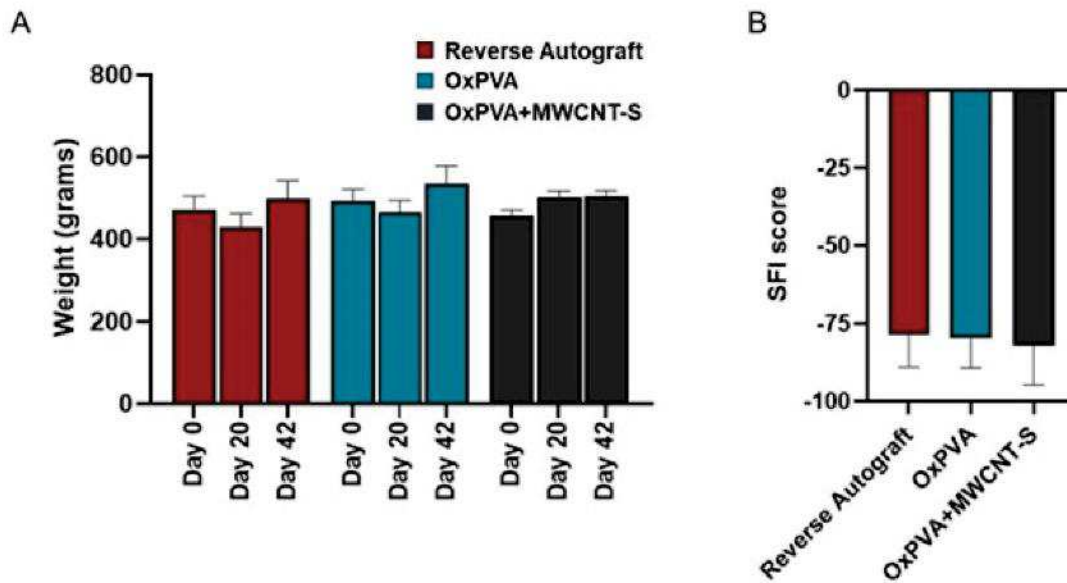


Figure 6. Animals' weight and functional recovery assessment. Animals' weight trend was evaluated at the day of surgery (Day 0), halfway through the experimental period (Day 20) and before the experimental endpoint (Day 42) (A). Sciatic functional index (SFI) score attribution before euthanasia. SFI around 0 suggests a normal nerve function; SFI around -100 is associated with total motor sciatic nerve dysfunction (B). No statistically significant differences were observed comparing the experimental groups in both weight and SFI score.

S100 (red) and the peripheral nerve fibers marker PGP9.5 (green); the conduit, still well recognizable, supported the structural reconnection between the two stumps (Figure 10).

Morphometric analysis

Morphometric analysis is mandatory to compare repair strategies outcomes. Regarding the total cross-section area (μm^2), that of Reverse Autograft ($1\,464\,490 \pm 22\,771.18$) was the highest ($P < 0.0001$) among that measured for all the other experimental groups (OxPVA: $216\,776.1 \pm 25\,593.49$; OxPVA+MWCNT-S: $359\,149.1 \pm 14\,831.18$) (OxPVA vs OxPVA+MWCNT-S: $P < 0.001$) (Figure 11A).

Similarly, focusing on fascicular area (μm^2), Reverse Autograft group again showed the highest ($P < 0.0001$) mean area value within the whole cohort ($740\,261.7 \pm 27\,650.72$) followed by OxPVA+MWCNT-S ($286\,320.8 \pm 16\,690.29$) and OxPVA ($147\,745 \pm 24\,352.76$). A statistically significant difference was also detected comparing OxPVA+MWCNT-S vs OxPVA ($***P < 0.001$) (Figure 11B).

Regarding the percentage (%) of epineural sheath thickness, the Reverse Autograft showed the highest values (50.42 ± 0.83) followed by OxPVA (25.91 ± 1.75) and OxPVA+MWCNT-S (20.10 ± 8.04). Significant differences were highlighted between Reverse Autograft and both OxPVA ($P < 0.01$) and OxPVA+MWCNT-S, respectively ($P < 0.001$) (Figure 11C).

The myelination and axons regeneration were also focused by toluidine-blue staining and TEM (Figure 12A). Hence, total myelinated axons/nerve and myelinated axons density (myelinated axons/ μm^2) were determined. Thus, fiber diameter, axon diameter, myelin thickness and g-ratio were determined not only to provide a regenerated tissue description but also to give important data related to functional recovery.

Considering total myelinated axons number/nerve (nerve fascicle), Reverse Autograft showed the highest mean value ($14\,236.52 \pm 1940.13$) within the cohort (OxPVA, 3249.30 ± 349.89 , $P < 0.001$; OxPVA+MWCNT-S, 6928.47 ± 1560.81 , $P < 0.01$). A significant difference was also highlighted between OxPVA+MWCNT-S and OxPVA ($P < 0.05$) (Figure 12B).

As regards the myelinated axons density (axons/ μm^2) (Figure 12C), the morphometric study displayed this descending order: Reverse Autograft (0.019745 ± 0.001188) > OxPVA (0.020826 ± 0.002151) > OxPVA+MWCNT-S (0.024198 ± 0.005451); no significant differences were detected within the cohort.

Fibers' diameter (μm) observed this trend: OxPVA (6.61 ± 0.30) > Reverse Autograft (6.37 ± 0.62) > OxPVA+MWCNT-S (4.44 ± 0.17); the OxPVA+MWCNT-S group displayed significant lower values than the other two experimental groups ($P < 0.01$) (Figure 12D).

Mean axons' diameter (μm) was calculated for each experimental group: OxPVA, 4.84 ± 0.20 > Reverse Autograft, 4.21 ± 0.33 > OxPVA+MWCNT-S, 3.00 ± 0.17 . Significant differences were detected comparing OxPVA vs Reverse Autograft ($P < 0.05$); OxPVA vs OxPVA+MWCNT-S ($P < 0.01$); Reverse Autograft vs OxPVA+MWCNT-S ($P < 0.001$) (Figure 12E).

Myelin sheath was measured (μm) and a progressive reduction in thickness was recognized according to the following order: Reverse Autograft (1.01 ± 0.07) > OxPVA (0.86 ± 0.04) > OxPVA+MWCNT-S (0.74 ± 0.02). The statistical analysis showed these significant differences: Reverse Autograft vs OxPVA and OxPVA vs OxPVA+MWCNT-S ($P < 0.05$); Reverse Autograft vs OxPVA+MWCNT-S ($P < 0.001$) (Figure 12F).

Additionally, the mean g-ratio (axon diameter/fiber diameter) was focused (Reverse Autograft, 0.65 ± 0.041 ; OxPVA, 0.76 ± 0.05 ; OxPVA+MWCNT-S 0.65 ± 0.02), significant differences were detected between OxPVA and the two other experimental groups ($P < 0.05$) (Figure 12G). As regards the g-ratio ranges distribution/prevalence (%) the interval 0.6–0.7 was mainly represented in the Reverse Autograft and OxPVA+MWCNT-S groups (39.47% and 46.81%, respectively) than in the OxPVA group (20.63%) which, in turn, mainly displayed the interval 0.7–0.8 (69.31%) compared to Reverse Autograft (33.68%) and OxPVA (28.72%) (Figure 12H–J).

Gastrocnemius muscle weight

Gastrocnemius muscle atrophy, associated with a reduction in muscle weight, is commonly encountered following sciatic nerve transection. The data collected, comparing the percentage of wet

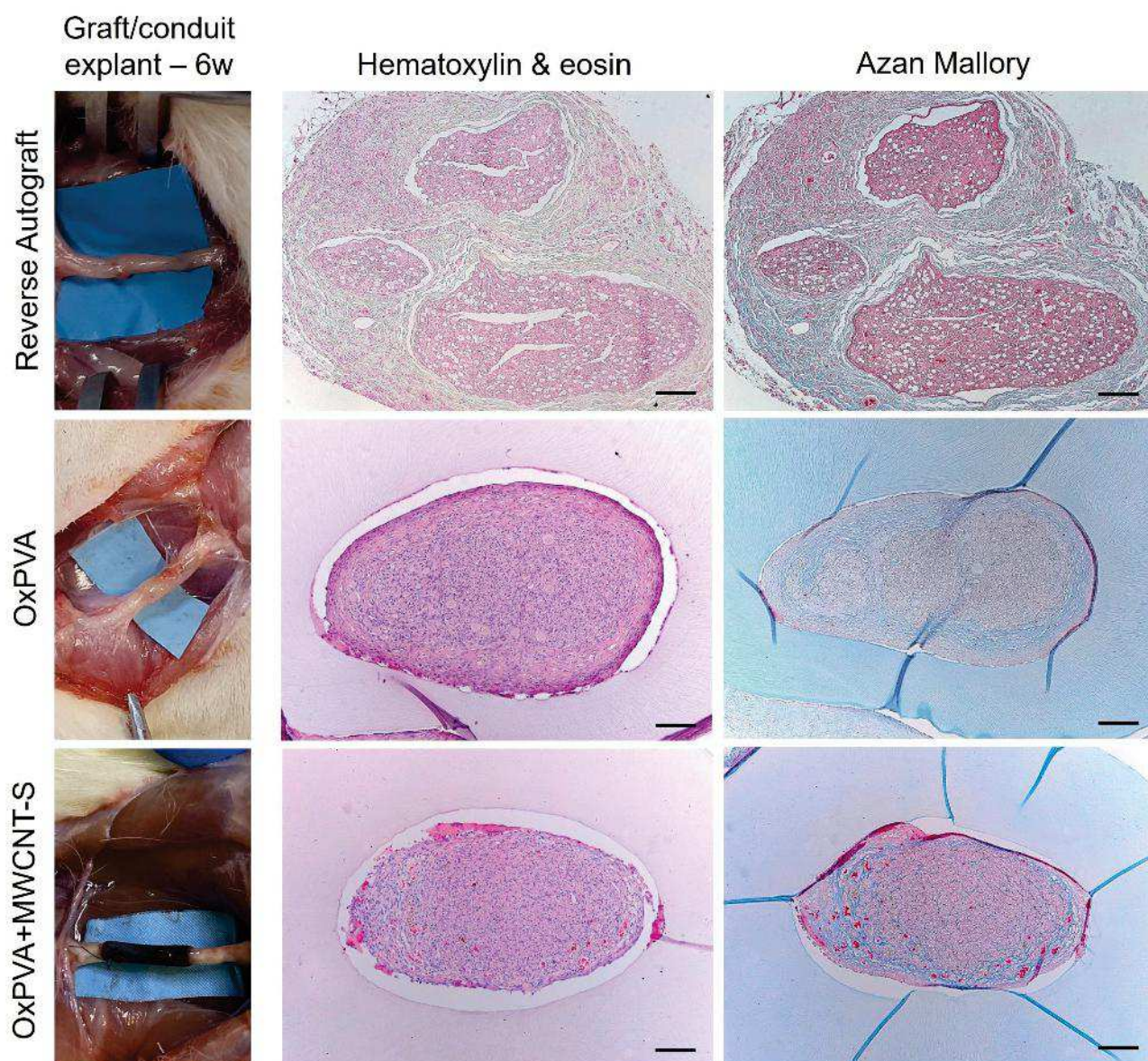


Figure 7. Reverse autograft and OxPVA-based nerve conduits at 6 weeks from surgery. Hematoxylin & eosin and Azan Mallory staining showing the overall appearance and fibro-connective tissue presence/distribution in correspondence of the Central sections of the explants. Scale bar: 100 μ m.

weight of the gastrocnemius muscles in operated limb vs contralateral side, showed no significant differences between the experimental groups. The percentage values showed this descending order: Reverse Autograft ($32.67 \pm 23.70\%$) > OxPVA ($30.33 \pm 18.61\%$) > OxPVA + MWCNT-S ($27.33 \pm 4.93\%$).

Discussion

Following peripheral nerve injury, the recovery of nerve function depends on the growth and extension of regenerated axons through the injured site until they reach and reinnervate the distal target organ [29]. Experimental evidence highlights conduit positioning as a promising alternative to autografts interposition. Tubular devices play a crucial role in guiding axons growth and providing a suitable microenvironment for release/diffusion of neurotrophic factors while also preventing fibro-connective tissue infiltration that can obstacle regeneration of a native-like tissue [30–32]. Within this context, emerging studies highlight the

potential of conductive nanomaterials in peripheral nerve regeneration as they simulate the electrophysiological microenvironment, thus promoting neurons growth, differentiation and spatial organization [33–36]. Notably, nanomaterials incorporation within hydrogels, leading to 'Hydrogel Hybrid' [37], is an attractive approach to tailor hydrogels for specific end-use destination [38]. Despite several research groups have suggested the use of CNTs in peripheral nerve regeneration, their potential role within nerve conduits needs to be fully defined [39].

Hydrogels are physically/chemically cross-linked natural or synthetic 3D networks displaying properties that are close to those of living tissues, despite being hardly hydrosoluble [40]. They can be cast into various shapes and retain high amounts of water; this latter characteristic is responsible for their own elastic and soft consistency, together with a low interfacial tension. Interestingly, carbon-based nanomaterials (SWCNT/MWCNT and graphene) can provide conventional hydrogels with improved mechanical and electrical properties [38]. However, their

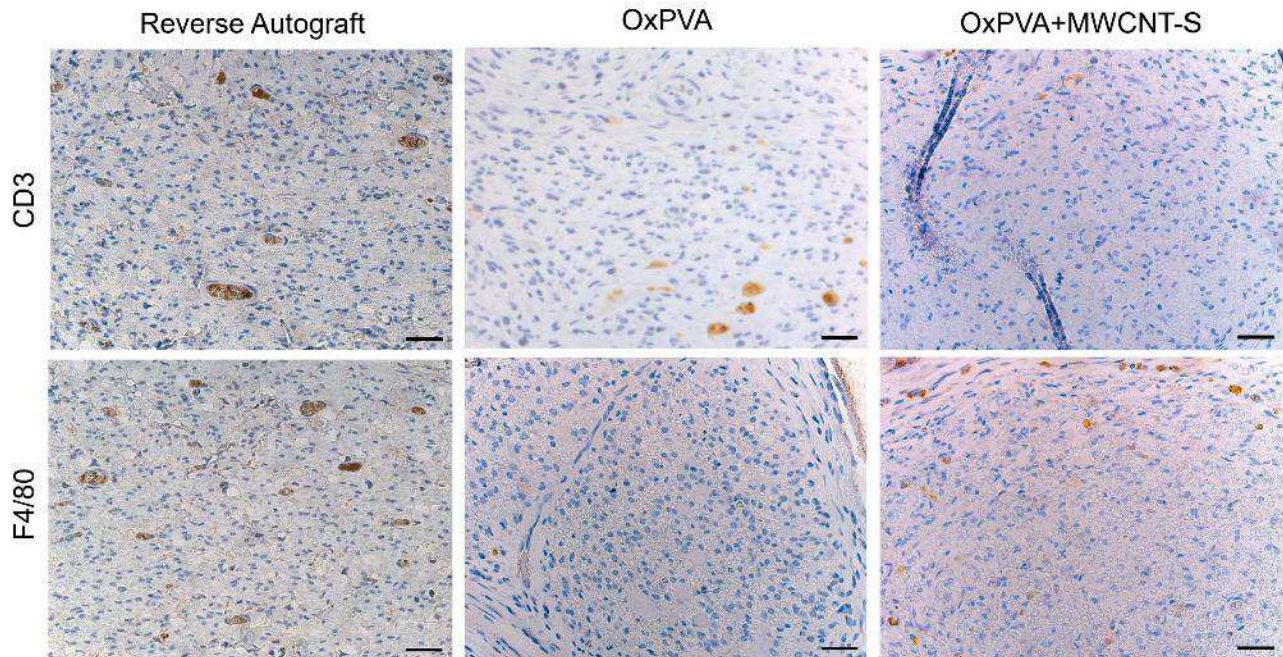


Figure 8. Immunolocalization of CD3 and F4/80 positive elements at the Central portion of the explants to highlight eventual presence of lymphocytes and macrophages, respectively. Scale bar: 25 μ m.

strong agglomerating tendency together with intrinsic insolubility in common solvents represent the two main critical issues associated with them [41].

In previous works [25, 42] we have broadly described an efficient functionalization method (i.e. introduction of benzenesulfonate functional groups by diazotization reaction) that allowed MWCNT solubilization in water and dispersion in the synthetic polymer OxPVA. Mechanical incorporation of 0.1 wt% MWCNT-S within OxPVA solution led to cross-linked hydrogels showing shift in coloration (dark), increased surface conductivity (OxPVA+ MWCNT-S: $1.81 \times 10^{-6} \pm 2.00 \times 10^{-7}$ S; OxPVA: $2.00 \times 10^{-10} \pm 9.16 \times 10^{-12}$ S) and a more complex nanoscale topography by SEM [25]. However, effectiveness of OxPVA+MWCNT-S tubular devices whether implanted in animal model of peripheral nerve lesion was not considered, thus representing the purpose of this work.

Regeneration of the peripheral nerve following substance loss is a complex event which requires the careful orchestration of several factors and cues to establish the ideal microenvironment [43]. Current advances in development of nerve conduits aim to create an internal milieu mimicking the natural one to guarantee for a better therapeutic efficacy [44, 45]. Once physically cross-linked, OxPVA+MWCNT-S conduits confirmed a certain nanoporosity in section with also surface alteration; this ultrastructural organization may have an interesting role in promoting adsorption of ECM proteins that are released during regeneration [43, 46] including plasma exudate rich in neurotrophic factors and ECM precursor molecules (fibrinogen and factor XIII) [3]. As discussed by Ravanbakhsh et al. [47], hydrogel pore size changes when nanoparticles are introduced in the network; in case of OxPVA, this event may be ascribed to both MWCNT-S mechanical incorporation method and their interaction with OxPVA chains. Additionally, it can be assumed that increase in nanoporosity further improves OxPVA ability in adsorb and release bioactive molecules [15, 20, 17] transforming the conduit luminal space into a regeneration camera for axons.

As mentioned above, hydrogels are considered highly suitable for nerve conduits fabrication due to their tissue-like main features (e.g. high water content, compliance porosity). However, their use is hindered because of scant mechanical behavior [48] affecting devices performances in guiding and supporting axonal growth [49]. According to previous evidence, this is not the case of OxPVA-derived conduits/wraps, showing to fit well the nerve end-stumps and resist at suture without giving rise to ruptures [2, 18, 19]. One of the mechanical requirements of a nerve conduit is to have an adequate SRS, which allows maintaining a structural continuity between the conduit and the stump during the regeneration process. The SRS of OxPVA and OxPVA+MWCNT-S varied between 0.23 and 0.27 N and between 0.12 and 0.23 N, respectively. These values are comparable with SRS values reported for other nerve conduits in the literature. For example, a double network hydrogel conduit based on gelatine and alginate developed by Kim et al. [48] showed SRS values varying approximately between 0.07 and 0.13 N, depending on the cross-linking method. In this work, both the wall thickness of the neural conduit and the suture thread caliber were close to the ones adopted in the present study. Moreover, our results highlighted that the incorporation of MWCNT-S into OxPVA hydrogel did not significantly modify SRS. This result confirmed that the mechanical tensile properties of the composite OxPVA+MWCNT-S at a concentration of 0.1% of carbon nanotubes are comparable to the mechanical properties of OxPVA alone [25].

After surgery, animals' wellbeing was monitored along time. There is consensus in defining a body-weight reduction of 20% or more as severe suffering and thereby as a potential parameter for humane endpoint decisions [50]. Here, implants were well tolerated by whole cohort further confirming previous evidence gathered for OxPVA [2, 18, 19] and suggesting the same also for the composite OxPVA+MWCNTs device.

Specific functional outcomes were assessed by SFI evaluation. Certainly, functional evaluations are difficult to carry on in animals but, despite some issues, the SFI method can be considered

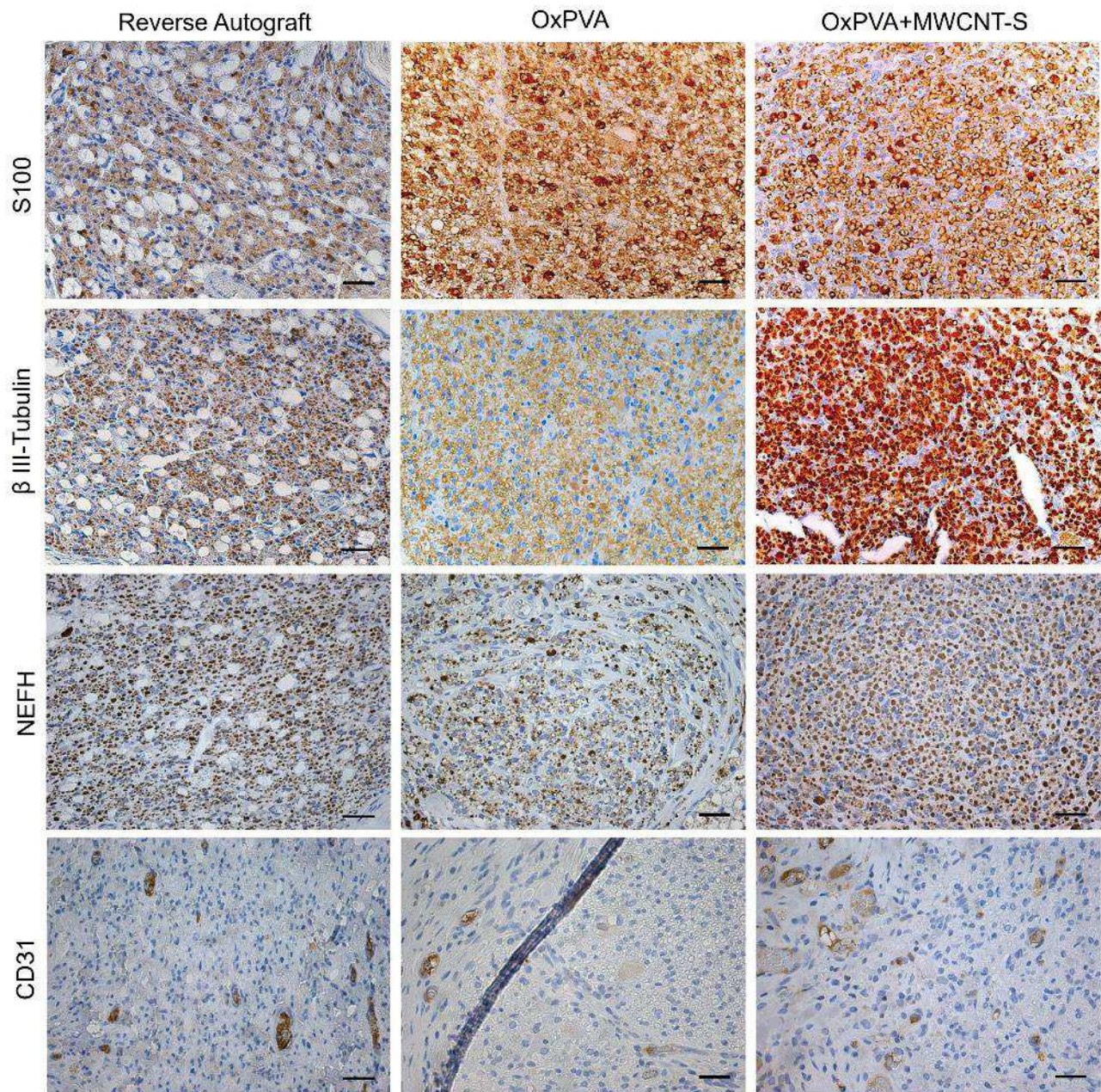


Figure 9. Immunolocalization of S-100 (Schwann cells), β III-tubulin (axons), NEFH (neurofilament heavy chain) and CD31 (endothelial cells) at the Central portion of the explants. Scale bar: 100 μ m.

the most versatile approach (low cost, easy to apply) compared to other methods [51]. Generally, the normal SFI value is approximately 0 [26, 52], that is far from the results collected by the three study groups. However, statistical analysis confirmed no significant differences within the cohort, suggesting that OxPVA-based conduits provide functional outcomes comparable to those of the gold standard RA. It can be assumed that the low values recorded depend on the early time of evaluation: measurable functional improvements may be detected after longer follow-up periods. In support of this, the SFI data observed in this study are consistent with those previously reported in the literature for the same injury model [53–55]. Contextually, our histological and morphological data provide early indicators of regeneration, which may precede identifiable functional recovery.

Following functional recovery assessment, the sciatic nerves were observed *in situ* prior to retrieval. As reported in previous studies by Stocco *et al.* [2, 15, 18, 19], the OxPVA-based hydrogels remained identifiable at the implant site suggesting the devices adequacy in supporting regeneration. Peripheral nerve regeneration typically occurs at a rate of approximately 1–3 mm/day, depending on the location of the injury (proximal vs distal) [56]. The reaction stoichiometry employed to obtain 1% OxPVA was specifically developed to enhance the biodegradability of cross-linked PVA, which is otherwise poorly degradable after cross-linking. In fact, as reported by Gao *et al.* [57], an ideal nerve conduit should remain stable in structure until the gap is bridged, and distal stump is re-innervated. Following this, the device can gradually degrade. Within this context, there is consensus on the

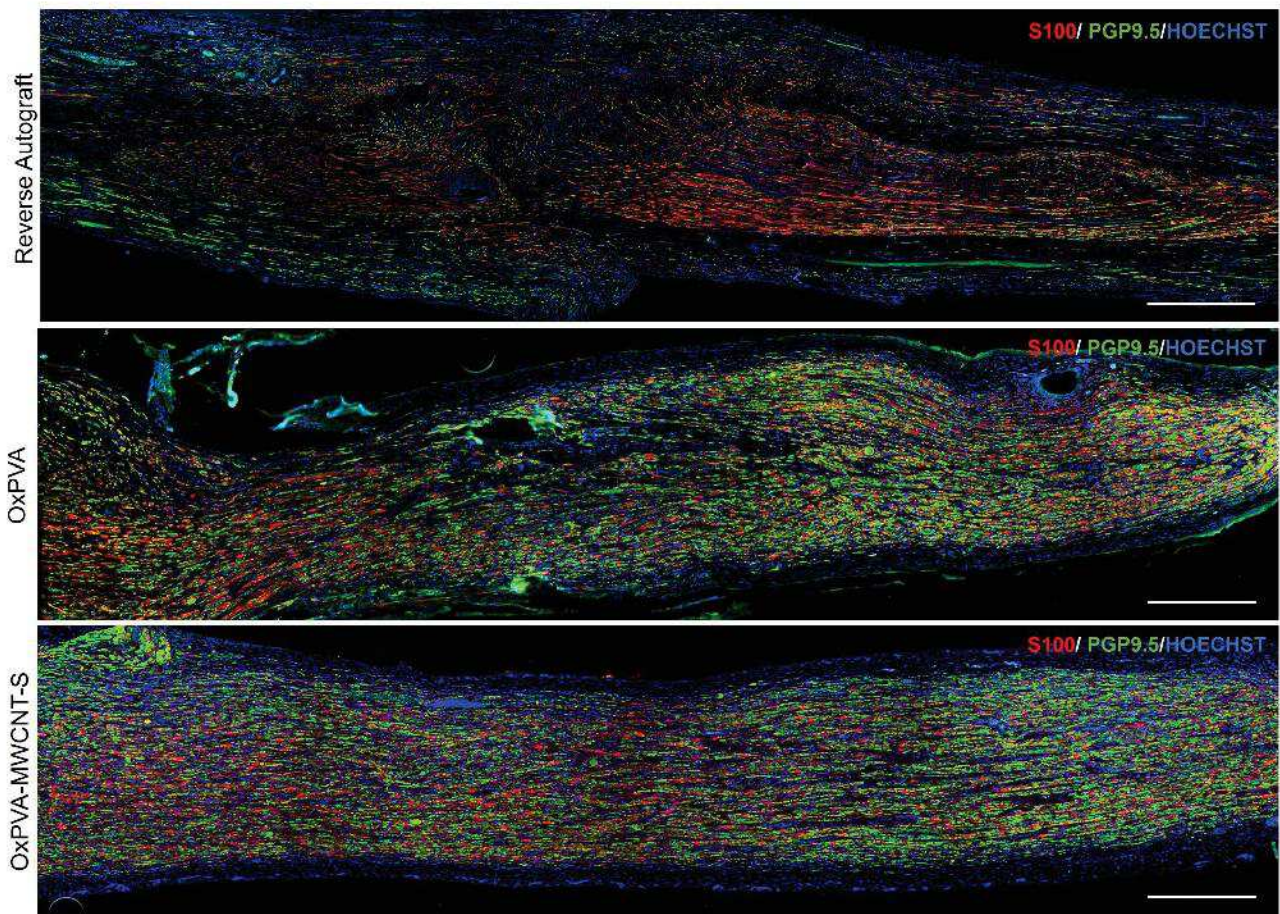


Figure 10. Immunofluorescence analysis of nerve regeneration after 6 weeks from surgery. Representative images of full-length longitudinal sections of the explanted grafts/conduits displaying newly regenerated axons. Double immunofluorescent staining shows Schwann cells (S100, red) and axons (PGP9.5, green). Cell nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bar: 500µm.

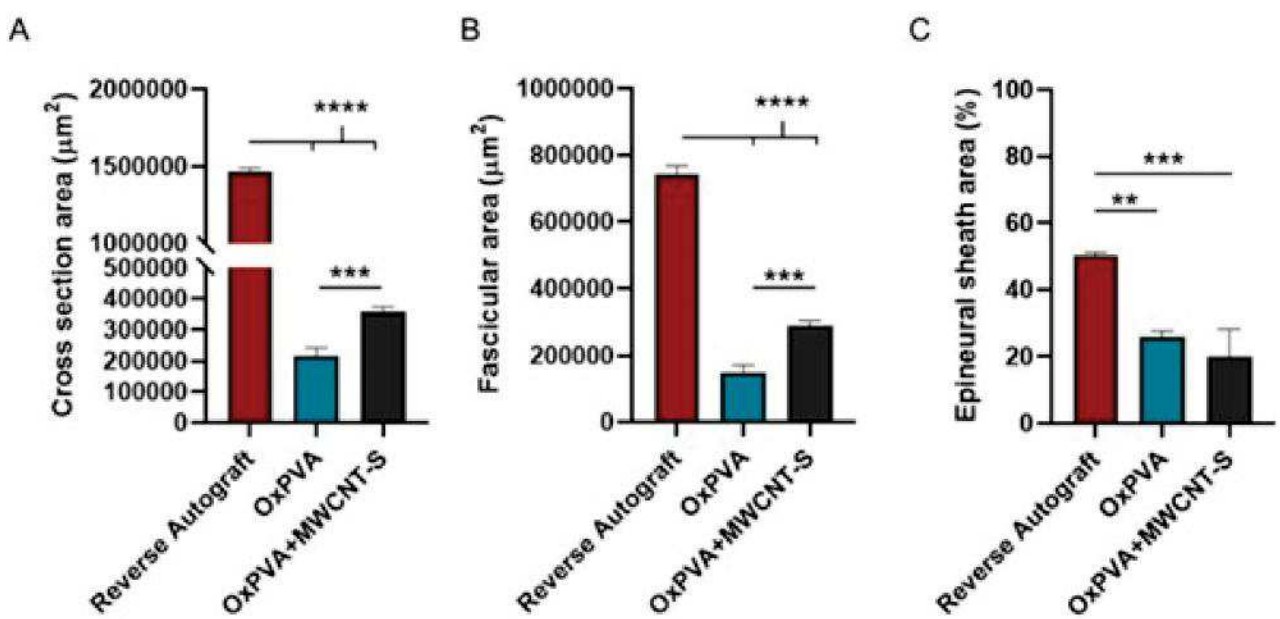


Figure 11. Morphometric analysis of Central transversal section. Histograms showing mean total cross-section nerve area (µm²) (A), fascicular area (µm²) (B) and epineurial sheath area (%) (C). (**P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001).

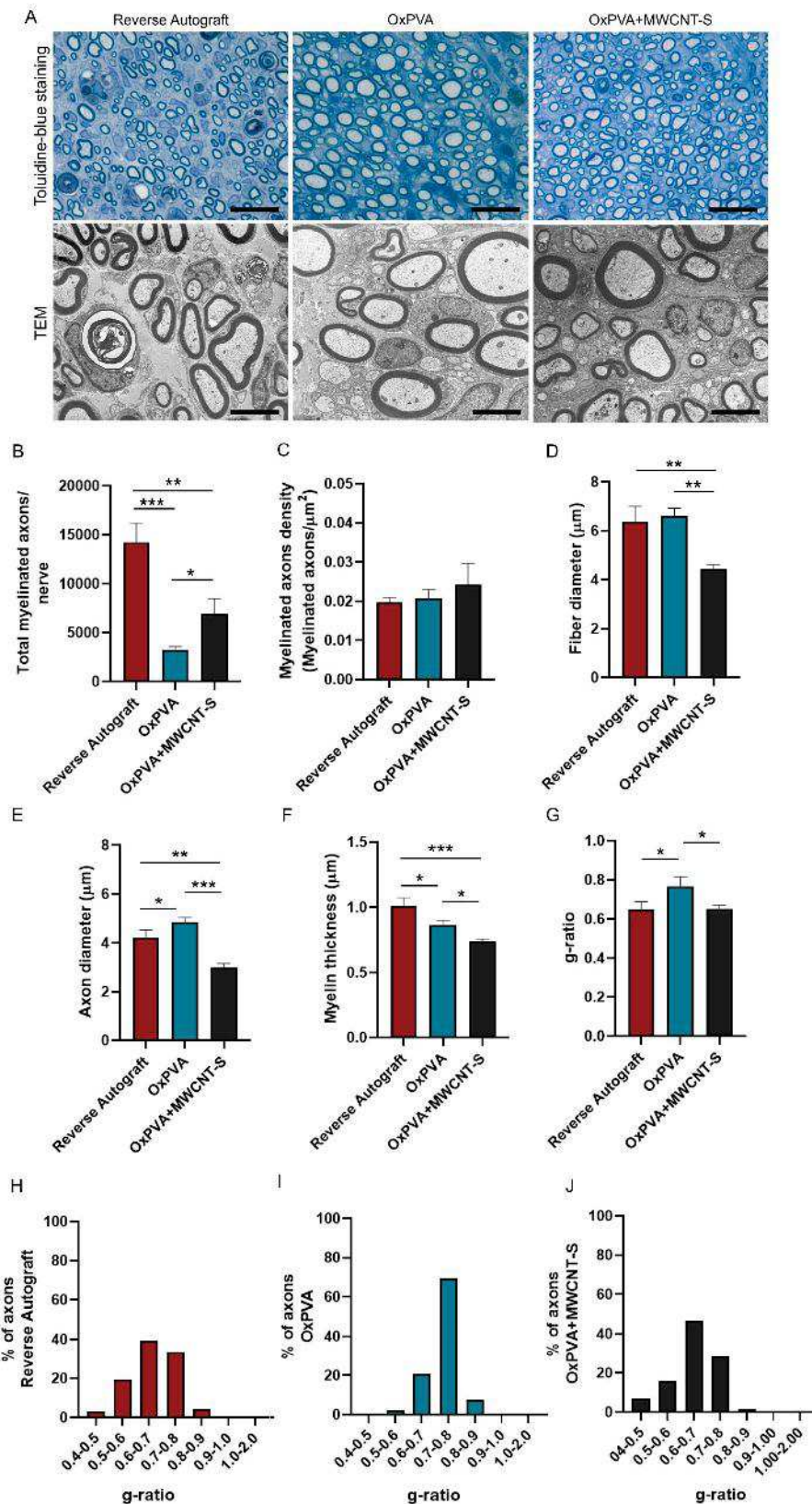


Figure 12. Myelinated axons analysis, Middle portion. (A) Regenerated tissue evaluation by toluidine blue staining and transmission electron microscopy (TEM) (scale bar: 20 μm (semithin sections); 6 μm , TEM images). (B, C) Histograms show total myelinated axons number/nerve (B) and myelinated axons density (number of axons/fascicular area (μm^2)) (C). (D-F) Histograms show mean fiber diameter (μm) (D), mean axon diameter (μm) (E), mean myelin thickness (μm) (F). (G) Mean g-ratio values calculated for each experimental group. (H-J) Assessment of g-ratio values distribution and percentage of prevalence for each experimental group. Results are reported as mean values $\pm$ SD (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

effects associated with improper degradation rates: whether too rapid it may result in swelling/inflammation; whether too slow, it can result in nerve compression, with eventual chronic immune rejection [57]. The degradation profile of 1% OxPVA aligns with these requirements, supporting its suitability for use in nerve conduits.

The regenerated tissue was evaluated through specific immunostaining/immunofluorescence analyses and morpho-structural evaluations. Immunopositivity toward markers for Schwann cells, axons and neurofilaments confirmed presence of nervous tissue inside the conduits; longitudinal sections (S100/PGP9.5 double labelled) corroborated the conjunction of the end-stumps. Additionally, epineurial tissue formation was highlighted by Azan Mallory (transversal sections, central portion); epineurium guarantees adequate microenvironment conditions that supports Schwann cells attachment and, therefore, promotes growth of axons with also angiogenic properties Siemionow et al. [58], 2020 as here confirmed by CD31 immunopositive elements. Angiogenesis is particularly important during reinnervation as it initiates nerve regeneration [59]. Intriguingly, blood vessels not only supply the tissue with blood, oxygen and nutrients, exerting a key role in peripheral nerve function but also provide a track for Schwann cell migration; this event is necessary for axonal pathfinding across the nerve bridge [60].

Materials based on CNT have been investigated for several biomedical applications. However, experimental data regarding CNT biocompatibility and toxicity in different biological environments are controversial: there are several studies showing that MWCNT-containing systems are innocuous, whereas others highlight their cytotoxicity. Together with CNT concentration, surface area, shape and size [61], their solubility in aqueous solvents is a prerequisite for biocompatibility thus avoiding their assemble in bundles due to strong hydrophobic and π - π interactions between tubes [36]. Following OxPVA+MWCNT-S conduits implantation, no severe inflammation signs were detected both macroscopically and after processing tissues (CD3; F4/80). Results were comparable within the cohort suggesting that the devices were all well tolerated, in accordance with previous evidence [25].

Morphometric study was finally performed focusing on cross-section area, fascicular area and epineurial sheath area together with myelinated axons number, density, mean diameter, myelin sheath thickness and g-ratio [2]. Nerve regeneration within a hollow conduit starts with the formation of an acellular fibrin cable between the two stumps, allowing for cells (Schwann cells, endothelial cells, fibroblasts) migration along it. After cells migration, the fibrin cable undergoes degradation with onset of remyelination by mature 'myelinating' phenotype Schwann cells that wrap around the regenerated axons to form the myelin sheath [3, 62]. Fiber and axon diameter and myelin thickness are fundamental to study the regeneration outcome as affecting the conduction velocity of the nerve impulse. In particular, conduction velocity seems to be more related to axon diameter than total fiber diameter [63]; increasing axon diameters accelerate action potential conduction along the axons [64]. Regarding g-ratio (ratio of inner axonal diameter to the total outer diameter), the value 0.6 is of interest being associated with optimize nerve impulses conduction. Contextually, if g-ratio values are below 0.4, it may advise for degenerated nerve fibers characterized by abnormal myelin sheath thickening, whereas values higher than 0.7 may indicate either regenerated fibers with thinner myelin sheath or demyelinated nerve fibers [2, 62, 65]. Focusing on study evidence, higher values of mean axon diameter were observed for OxPVA vs OxPVA+MWCNT-S; the same was for fiber diameter and myelin

thickness. However, despite this may suggest better functional outcomes with OxPVA NCs than composite device, it must be noticed that both the total myelinated axons/nerve and axons' density are higher for the OxPVA+MWCNT-S group than OxPVA, possibly mitigating functionality assessment based on the sole g-ratio. Furthermore, g-ratio distribution highlighted for OxPVA+MWCNT-S and Reverse Autograft the same trend; most nerve fibers fell within the 0.6–0.7 interval (46.81% and 39.47%, respectively) followed by 0.7–0.8 interval (28.72% and 33.68%, respectively); differently, OxPVA distinguished for a 0.7–0.8 interval (69.31%) prevalence.

Certainly, including electrophysiological evaluation, outcomes referring to a longer period of *in vivo* implant, and data on a sham control group (here not provided and possibly representing a study limit), would be fundamental to fully assessing motor recovery in this sciatic nerve defect model. The lack of a sham group prevents direct comparison with native, uninjured nerve tissue; however, the inclusion of the Reverse Autograft group, widely regarded as a clinical gold standard, gives a benchmark for evaluating the regenerative performance of the OxPVA and OxPVA+MWCNT-S conduits against a standard approach broadly used in clinical practice. Despite these limitations, the experimental evidence gathered here represents a significant step toward the identification of more effective NCs for peripheral nerve regeneration, based on enhanced hydrogels incorporated with electroconductive nanomaterials.

Conclusions

In this work, we explored and confirmed the potential of a new hybrid nanocomposite material for NCs fabrication, derived from the combination of OxPVA hydrogel with MWCNT-S. Interestingly, the incorporation of MWCNT-S (0.1 wt%) within OxPVA polymer solution proved to be effective: it was low-dose, homogeneous and did not affect/compromise the mechanical strength of the cross-linked material. Moreover, preclinical study evidence including histological, immunohistochemical and immunofluorescence analyses of the explants showed that the composite NCs promoted tissue regeneration with Schwann cells, axons and blood vessels that were all recognized, without signs of inflammation. These results are in accordance with previous evidence [25] where the presence of MWCNT-S into OxPVA was not associated with cytotoxicity *in vitro* or local signs of inflammation after subcutaneous implantation (14 and 42 days), proving composite material biocompatibility.

Regarding regenerated nerve morphometric analysis, lower values in terms of cross-section area and fascicular area were observed in OxPVA+MWCNT-S conduits compared to the Reverse Autograft group, though not in comparison with OxPVA alone. However, it should be noted that Reverse Autograft implantation does not represent a *de novo* regeneration process, as occurs with hollow conduits. This may explain the observed results, including the highest total number of myelinated axons per nerve in the Reverse Autograft group. The epineurial sheath area (%) was most represented in the Reverse Autograft group, followed by OxPVA and OxPVA+MWCNT-S. The thickness of the epineurium in a regenerated nerve likely reflects the interplay between axonal regeneration, inflammatory activity and ECM remodeling. It may appear increased as consequence of fibrosis or protective mechanisms or reduced because of a diminished inflammatory or fibrotic response with a limited connective tissue deposition [66, 67]. Myelinated axon density was highest in the OxPVA+MWCNT-S group. Regarding morphometric axonal data

used for g-ratio calculation, the g-ratio distribution showed a similar trend between the OxPVA+MWCNT-S and Reverse Autograft groups.

In the future, attention will be directed toward evaluating the performance of composite NCs in bridging larger nerve gaps (≥ 1 cm), as well as assessing their long-term efficacy and safety through extended follow-up studies to comprehensively evaluate functional outcomes. This approach will help to better understand their full therapeutic potential in clinically relevant scenarios. Moreover, incorporating electrophysiological assessments could provide a more accurate characterization of functional recovery over time across the cohort, in relation to the specific treatment.

Acknowledgements

PhD fellowship of L.C. was financed by PON 2024-2020 (National Operative Program 'Research and Innovation') D.M. n.1061, 10 August, 2021, Action IV.5.

Funding

Research was supported by PON REACT-EU Programme.

Conflicts of interest statement. The authors have no conflicts to disclose.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Parker BJ, Rhodes DI, O'Brien CM, Rodda AE, Cameron NR. Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: a commercial perspective. *Acta Biomater* **2021**;135:64–86.
- Stocco E, Barbon S, Faccio D, Petrelli L, Incendi D, Zamuner A, De Rose E, Confalonieri M, Tolomei F, Todros S, Tiengo C, Macchi V, Dettin M, de Caro R, Porzionato A. Development and preclinical evaluation of bioactive nerve conduits for peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Mater Today Bio* **2023**;22:100761.
- Lizarraga-Valderrama LR, Ronchi G, Nigmatullin R, Fregnan F, Basnett P, Paxinou A, Geuna S, Roy I. Preclinical study of peripheral nerve regeneration using nerve guidance conduits based on polyhydroxyalkanoates. *Bioeng Transl Med* **2021**;6:e10223.
- Sun R, Lang Y, Chang MW, Zhao M, Li C, Liu S, Wang B. Leveraging oriented lateral walls of nerve guidance conduit with core-shell MWCNTs fibers for peripheral nerve regeneration. *Adv Healthc Mater* **2024**;13:e2303867.
- Liu C, Fan L, Tian Z, Wen H, Zhou L, Guan P, Luo Y, Chan C, Tan G, Ning C, Rong L, Liu B. Self-curling electroconductive nerve dressing for enhancing peripheral nerve regeneration in diabetic rats. *Bioact Mater* **2021**;6:3892–903.
- Dresvyaniina EN, Tagandurdyeva NA, Kodolova-Chukhontseva VV, Dobrovol'skaya IP, Kamalov AM, Nashchekina YA, Nashchekin AV, Ivanov AG, Yukina GY, Yudin VE. Structure and properties of composite fibers based on chitosan and single-walled carbon nanotubes for peripheral nerve regeneration. *Polymers (Basel)* **2023**;15:2860.
- Park J, Jeon J, Kim B, Lee MS, Park S, Lim J, Yi J, Lee H, Yang HS, Lee JY. Electrically conductive hydrogel nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration. *Adv Funct Materials* **2020**;30:2003759.
- Mattson MP, Haddon RC, Rao M. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J Mol Neurosci* **2000**;14:175–82.
- Fabbro A, Bosi S, Ballerini L, Prato M. Carbon nanotubes: artificial nanomaterials to engineer single neurons and neuronal networks. *ACS Chem Neurosci* **2012**;3:611–8.
- Fabbro A, Prato M, Ballerini L. Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**;65:2034–44.
- Kunisaki A, Kodama A, Ishikawa M, Ueda T, Lima MD, Kondo T, Adachi N. Carbon-nanotube yarns induce axonal regeneration in peripheral nerve defect. *Sci Rep* **2021**;11:19562.
- Kunisaki A, Kodama A, Ishikawa M, Ueda T, Lima MD, Kondo T, Adachi N. Oxidation-treated carbon nanotube yarns accelerate neurite outgrowth and induce axonal regeneration in peripheral nerve defect. *Sci Rep* **2023**;13:21799.
- Zhou Z, Liu X, Wu W, Park S, Miller AL, II, Terzic A, Lu L. Effective nerve cell modulation by electrical stimulation of carbon nanotube embedded conductive polymeric scaffolds. *Biomater Sci* **2018**;6:2375–85.
- Stocco E, Barbon S, Radossi P, Rajendran S, Dalzoppo D, Bortolami M, Bagno A, Grandi F, Gamba PG, Parnigotto PP, Tagariello G, Grandi C. Autologous chondrocytes as a novel source for neo-chondrogenesis in haemophilic. *Cell Tissue Res* **2016**;366:51–61.
- Stocco E, Barbon S, Grandi F, Gamba PG, Borgio L, del Gaudio C, Dalzoppo D, Lora S, Rajendran S, Porzionato A, Macchi V, Rambaldo A, de Caro R, Parnigotto PP, Grandi C. Partially oxidized polyvinyl alcohol as a promising material for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **2017**;11:2060–70.
- Grandi F, Stocco E, Barbon S, Rambaldo A, Contran M, Fascetti Leon F, Gamba P, Parnigotto PP, Macchi V, de Caro R, Porzionato A. Composite scaffolds based on intestinal extracellular matrices and oxidized polyvinyl alcohol: a preliminary study for a new regenerative approach in short bowel syndrome. *BioMed Res Int* **2018**;2018:7824757.
- Barbon S, Stocco E, Negro A, Dalzoppo D, Borgio L, Rajendran S, Grandi F, Porzionato A, Macchi V, De Caro R, Parnigotto PP, Grandi C. In vitro assessment of TAT-ciliary neurotrophic factor therapeutic potential for peripheral nerve regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* **2016**;309:121–8.
- Stocco E, Barbon S, Lora L, Grandi F, Sartore L, Tiengo C, Petrelli L, Dalzoppo D, Parnigotto PP, Macchi V, de Caro R, Porzionato A, Grandi C. Partially oxidized polyvinyl alcohol conduit for peripheral nerve regeneration. *Sci Rep* **2018**;8:604.
- Stocco E, Barbon S, Macchi V, Tiengo C, Petrelli L, Rambaldo A, Borean A, Capelli S, Filippi A, Romanato F, Parnigotto PP, Grandi C, De Caro R, Porzionato A. New bioresorbable wraps based on oxidized polyvinyl alcohol and leukocyte-fibrin-platelet membrane to support peripheral nerve neurorrhaphy: preclinical comparison versus NeuraWrap. *Sci Rep* **2019**;9:17193.
- Porzionato A, Barbon S, Stocco E, Dalzoppo D, Contran M, De Rose E, Parnigotto PP, Macchi V, Grandi C, De Caro R. Development of oxidized polyvinyl alcohol-based nerve conduits coupled with the ciliary neurotrophic factor. *Materials* **2019**;12:1996.
- Barbon S, Stocco E, Dalzoppo D, Todros S, Canale A, Boscolo-Berto R, Pavan P, Macchi V, Grandi C, De Caro R, Porzionato A. Halogen-mediated partial oxidation of polyvinyl alcohol for tissue engineering purposes. *Int J Mol Sci* **2020**;21:801.

22. Stocco E, Barbon S, Lamanna A, De Rose E, Zamuner A, Sandrin D, Marsotto M, Auditore A, Messina GML, Licciardello A, Iucci G, Macchi V, De Caro R, Dettin M, Porzionato A. Bioactivated oxidized polyvinyl alcohol towards next-generation nerve conduits development. *Polymers (Basel)*. **2021**;13:3372.
23. Scapin G, Bertalot T, Vicentini N, Gatti T, Tescari S, De Filippis V, Marega C, Menna E, Gasparella M, Parnigotto PP, Di Liddo R, Filippini F. Neuronal commitment of human circulating multipotent cells by carbon nanotube-polymer scaffolds and biomimetic peptides. *Nanomedicine (Lond)* **2016**;11:1929–46.
24. Vicentini N, Gatti T, Salice P, Scapin G, Marega C, Filippini F, Menna E. Covalent functionalization enables good dispersion and anisotropic orientation of multi-walled carbon nanotubes in a poly(l-lactic acid) electrospun nanofibrous matrix boosting neuronal differentiation. *Carbon N Y* **2015**;95:725–30.
25. Stocco E, Barbon S, Ceroni L, Confalonieri M, Pulzato G, Pressi S, D'Osualdo A, Contran M, Boscolo-Berto R, Tiengo C, Todros S, Pavan PG, Macchi V, De Caro R, Calvillo L, Menna E, Porzionato A. Partially oxidized polyvinyl alcohol + functionalized water soluble multiwalled carbon nanotubes: a new conductive nanocomposite material with promising implications for neuroregeneration. *J Sci Adv Mater Devices* **2024**;9:100762.
26. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* **1989**;83:129–38.
27. Petersen J, Russell L, Andrus K, MacKinnon M, Silver J, Klot M. Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery* **1996**;38:976–83.
28. Vicentini N, Gatti T, Salerno M, Hernandez Gomez YS, Bellon M, Gallio S, Marega C, Filippini F, Menna E. Effect of different functionalized carbon nanostructures as fillers on the physical properties of biocompatible poly(l-lactic acid) composites. *Mater Chem Phys* **2018**;214:265–76.
29. Zhao Y, Liu Y, Lu C, Sun D, Kang S, Wang X, Lu L. Reduced graphene oxide fibers combined with electrical stimulation promote peripheral nerve regeneration. *Int J Nanomedicine* **2024**;19:2341–57.
30. Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini K. Functional, histomorphometrical and immunohistochemical assessment of sciatic nerve regeneration through inside-out vein graft in rat. *Iran J Vet Surg* **2008**;03:39–50.
31. Taifebagerlu J, Mohammadi R. Effect of local administration of brain derived neurotrophic factor with silicone conduit on peripheral nerve regeneration: a rat sciatic nerve transection model. *Iran J Vet Surg* **2015**;10:43–52.
32. Stocco E, Barbon S, Emmi A, Tiengo C, De Caro R, Macchi V, Porzionato A. Commentary: techniques and graft materials for repairing peripheral nerve defects. *Front Neurol* **2024**;15:1420324.
33. Min JH, Patel M, Koh WG. Incorporation of conductive materials into hydrogels for tissue engineering applications. *Polymers (Basel)* **2018**;10:1078.
34. Zhao Y, Liu Y, Kang S, Sun D, Liu Y, Wang X, Lu L. Peripheral nerve injury repair by electrical stimulation combined with graphene-based scaffolds. *Front Bioeng Biotechnol* **2024**;12:1345163.
35. Nabipour M, Mellati A, Abasi M, Barough SE, Karimizade A, Banikarimi P, Hasanzadeh E. Preparation of bilayer tissue-engineered polyurethane/poly-L-lactic acid nerve conduits and their in vitro characterization for use in peripheral nerve regeneration. *J Biol Eng* **2024**;18:16.
36. Liu S, Yu JM, Gan YC, Qiu XZ, Gao ZC, Wang H, Chen SX, Xiong Y, Liu GH, Lin SE, McCarthy A, John JV, Wei DX, Hou HH. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. *Mil Med Res* **2023**;10:16.
37. Vashist A, Kaushik A, Vashist A, Sagar V, Ghosal A, Gupta YK, Ahmad S, Nair M. Advances in carbon nanotubes-hydrogel hybrids in nanomedicine for therapeutics. *Adv Healthc Mater* **2018**;7:e1701213.
38. Biondi M, Borzacchiello A, Mayol L, Ambrosio L. Nanoparticle-integrated hydrogels as multifunctional composite materials for biomedical applications. *Gels* **2015**;1:162–78.
39. Oprych KM, Whitby RL, Mikhalovsky SV, Tomlins P, Adu J. Repairing peripheral nerves: is there a role for carbon nanotubes? *Adv Healthc Mater* **2016**;5:1253–71.
40. Ho TC, Chang CC, Chan HP, Chung TW, Shu CW, Chuang KP, Duh TH, Yang MH, Tyan YC. Hydrogels: properties and applications in biomedicine. *Molecules* **2022**;27:2902.
41. Díez-Pascual AM. Chemical functionalization of carbon nanotubes with polymers: a brief overview. *Macromol* **2021**;1:64–83.
42. Ceroni L, Benazzato S, Pressi S, Calvillo L, Marotta E, Menna E. Enhanced adsorption of methylene blue dye on functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Nanomaterials (Basel)* **2024**;14:522.
43. Bryan DJ, Litchfield CR, Manchio JV, Logvinenko T, Holway AH, Austin J, Summerhayes IC, Rieger-Christ KM. Spatiotemporal expression profiling of proteins in rat sciatic nerve regeneration using reverse phase protein arrays. *Proteome Sci* **2012**;10:9.
44. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, Brook GA. Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. *Prog Neurobiol* **2010**;92:245–76.
45. Mankavi F, Ibrahim R, Wang H. Advances in biomimetic nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration. *Nanomaterials (Basel)* **2023**;13:2528.
46. Namgung S, Kim T, Baik KY, Lee M, Nam JM, Hong S. Fibronectin-carbon-nanotube hybrid nanostructures for controlled cell growth. *Small* **2011**;7:56–61.
47. Ravanbakhsh H, Karamzadeh V, Bao G, Mongeau L, Juncker D, Zhang YS. Emerging technologies in multi-material bioprinting. *Adv Mater* **2021**;33:e2104730.
48. Kim J, Park J, Choe G, Jeong SI, Kim HS, Lee JY. A gelatin/alginate double network hydrogel nerve guidance conduit fabricated by a chemical-free gamma radiation for peripheral nerve regeneration. *Adv Healthc Mater* **2024**;13:e2400142.
49. Zhang S, Vijayavenkataraman S, Chong GL, Fuh JYH, Lu WF. Computational design and optimization of nerve guidance conduits for improved mechanical properties and permeability. *J Biomech Eng* **2019**;141:051007.
50. Talbot SR, Biernot S, Bleich A, van Dijk RM, Ernst L, Häger C, Helgers SOA, Koegel B, Koska I, Kuhla A, Miljanovic N, Müller-Graff FT, Schwabe K, Tolba R, Vollmar B, Weegh N, Wölk T, Wolf F, Wree A, Ziegowski L, Potschka H, Zechner D. Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Lab Anim* **2020**;54:99–110.
51. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods* **2008**;170:255–61.
52. Ju C, Park E, Kim T, Kim T, Kang M, Lee KS, Park SM. Effectiveness of electrical stimulation on nerve regeneration after crush injury: comparison between invasive and non-invasive stimulation. *PLoS One* **2020**;15:e0233531.
53. Weber RA, Warner MR, Verheyden CN, Proctor WH. Functional evaluation of gap vs. abutment repair of peripheral nerves in the rat. *J Reconstr Microsurg* **1996**;12:159–63.
54. Brogan DM, Dy CJ, Rioux-Forker D, Wever J, Leversedge FJ. Influences of repair site tension and conduit splinting on peripheral nerve reconstruction. *Hand (N Y)* **2022**;17:1048–54.

55. Zhao X, Fede C, Petrelli L, Pirri C, Stocco E, Fan C, Porzionato A, Tiengo C, De Caro R, Masiero S, Stecco C. The impact of sciatic nerve injury on extracellular matrix of lower limb muscle and thoracolumbar fascia: an observational study. *Int J Mol Sci* **2024**;25:8945.
56. Dogny C, André-Lévigne D, Kalbermatten DF, Madduri S. Therapeutic potential and challenges of mesenchymal stem cell-derived exosomes for peripheral nerve regeneration: a systematic review. *Int J Mol Sci* **2024**;25:6489.
57. Gao S, Chen X, Lu B, Meng K, Zhang K-Q, Zhao H. Recent advances on nerve guide conduits based on textile methods. *Smart Mater Med* **2023**;4:368–83.
58. Siemionow M, Strojny MM, Kozłowska K, Brodowska S, Graukazmierczak W, Cwykiel J. Application of human epineural conduit supported with human mesenchymal stem cells as a novel therapy for enhancement of nerve gap regeneration. *Stem Cell Rev Rep* **2022**;18:642–59.
59. Hu T, Chang S, Qi F, Zhang Z, Chen J, Jiang L, Wang D, Deng C, Nie K, Xu G, Wei Z. Neural grafts containing exosomes derived from Schwann cell-like cells promote peripheral nerve regeneration in rats. *Burns Trauma* **2023**;11:tkad013.
60. Fornasari BE, Zen F, Nato G, Fogli M, Luzzati F, Ronchi G, Raimondo S, Gambarotta G. Blood vessels: the pathway used by Schwann cells to colonize nerve conduits. *Int J Mol Sci* **2022**;23:2254.
61. García Verdugo KF, Salazar Salas BM, Chan LHC, Rodríguez Félix DE, Quiroz Castillo JM, Castillo Castro TD. Nanocomposite hydrogels based on poly(vinyl alcohol) and carbon nanotubes for NIR-light triggered drug delivery. *ACS Omega* **2024**;9:11860–9.
62. Stocco E, Barbon S, Emmi A, Tiengo C, Macchi V, De Caro R, Porzionato A. Bridging gaps in peripheral nerves: from current strategies to future perspectives in conduit design. *Int J Mol Sci* **2023**;24:9170.
63. Gillespie MJ, Stein RB. The relationship between axon diameter, myelin thickness and conduction velocity during atrophy of mammalian peripheral nerves. *Brain Res* **1983**;259:41–56.
64. Costa AR, Pinto-Costa R, Sousa SC, Sousa MM. The regulation of axon diameter: from axonal circumferential contractility to activity-dependent axon swelling. *Front Mol Neurosci* **2018**;11:319.
65. Rushton WA. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* **1951**;115:101–22.
66. Kong L, Gao X, Qian Y, Sun W, You Z, Fan C. Biomechanical microenvironment in peripheral nerve regeneration: from pathophysiological understanding to tissue engineering development. *Theranostics* **2022**;12:4993–5014.
67. Qiu S, Deng PJ, He FL, Yan LW, Tu ZH, Liu XL, Quan DP, Bai Y, Zheng CB, Zhu QT. A decellularized nerve matrix scaffold inhibits neuroma formation in the stumps of transected peripheral nerve after peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* **2023**;18:664–70.