



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 102015015249-3 A2**

**(22) Data do Depósito:** 24/06/2015

**(43) Data da Publicação:** 19/09/2017



**(54) Título:** SUBSTITUTO TISSULAR, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, USO DE SUBSTITUTO TISSULAR E PROCESSO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL

**(51) Int. Cl.:** A61L 27/22; A61L 27/60

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**(72) Inventor(es):** DANIELA STEFFENS;  
PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE

**(57) Resumo:** SUBSTITUTO TISSULAR, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, Uso DE SUBSTITUTO TISSULAR E PROCESSO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL. A presente invenção refere-se a um substituto tissular que compreende a proteína laminina ligada a uma matriz polimérica, à composição que compreende o dito substituto tissular e ao processo de obtenção do referido substituto tissular. A presente invenção também se refere ao uso de substituto tissular no preparo de uma composição para regeneração tecidual e a um processo de regeneração tecidual compreendendo a etapa de contatar o dito substituto tissular com pelo menos um tecido ex-vivo. A presente invenção situa-se nos campos da Química, da Farmácia, da Medicina e da Engenharia de Biomateriais.



## SUBSTITUTO TISSULAR, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, USO DE SUBSTITUTO TISSULAR E PROCESSO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL

### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção refere-se a um substituto tissular que compreende a proteína laminina ligada a uma matriz polimérica, à composição que compreende o dito substituto tissular e ao processo de obtenção do referido substituto tissular. A presente invenção também se refere ao uso de substituto tissular no preparo de uma composição para regeneração tecidual e a um processo de regeneração tecidual compreendendo a etapa de contatar o dito substituto tissular com pelo menos um tecido *ex-vivo*. A presente invenção situa-se nos campos da Química, da Farmácia, da Medicina e da Engenharia de Biomateriais.

### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** Os materiais biológicos atualmente utilizados como substitutos tissulares são produzidos de acordo com a fisiologia do local onde se pretende implantá-lo, podendo ser de colágeno bovino modificado, titânio, hidroxiapatita, polietileno de ultra-alto peso molecular, entre outros. Dentre as novas tecnologias, encontram-se a impressão tridimensional, o *electrospinning* e o *salting out*.

**[0003]** Os substitutos que utilizam em sua constituição materiais bovinos apresentam perigo de contaminação por patógenos e a geração de resposta antigênica. Já os materiais de titânio não são degradados pelo organismo e, por isso, permanecem no corpo humano indefinidamente, visto que também não se consegue mais retirá-lo sem lesar novamente a área previamente lesada.

**[0004]** Até o presente momento não são comercializados substitutos aos quais possam ser integradas células, sejam elas do próprio paciente ou de outra pessoa. Uma grande desvantagem apresentada por alguns tipos de substitutos é a necessidade de realização de dois procedimentos cirúrgicos no paciente, um para colocação do implante e outro para retirada de tecido do

próprio paciente e implantação sobre o implante. Outros problemas encontrados nos substitutos cutâneos, como baixa vascularização, cicatrização, ausência de componentes celulares diferenciados, déficit de suporte mecânico e de manuseio, entre outros ainda são frequentes nos atuais equivalentes disponíveis, tornando-se necessário o desenvolvimento de substitutos que minimizem ou eliminem essas desvantagens.

**[0005]** É fato que o tratamento para pacientes gravemente feridos por queimaduras ou grandes lesões cutâneas ainda não é totalmente efetivo. Dessa forma, o presente invento traz a possibilidade de uma cura mais rápida, diminuindo as infecções recorrentes de tratamentos demoradas e com exposição completa do meio interno corporal.

**[0006]** O presente invento apresenta um material capaz de eliminar todas essas desvantagens, visto que é um material sintético, biodegradável e biocompatível, que permite a sementeira de células previamente ao implante do biomaterial no corpo humano e, também serve como uma ponte, onde células do próprio paciente podem adentrar essa estrutura.

**[0007]** Destaca-se que o mercado de curativos/substitutos de pele é um mercado crescente. Dados obtidos no DATASUS em 17/07/2014 mostram que no período de um ano (retroativo) houve 1650 internações pelo SUS devido a queimaduras e corrosões. O valor gasto no tratamento desses pacientes foi de R\$ 3.631.467,16 (três milhões, seiscentos trinta e um mil, quatrocentos sessenta e sete reais e dezesseis centavos). No setor de cosméticos e farmacêuticos, ambos em franca expansão, o uso de pele artificial para fins de testes terapêuticos é uma grande oportunidade. Esses modelos são importados e muito caros. Soma-se a isso a política internacional de evitar testes usando cobaias de laboratório. É uma oportunidade de produzir um produto competitivo e tecnológico a nível mundial.

**[0008]** Com relação à literatura patentária, foram analisados alguns documentos, porém não foram encontradas descrições que revelem o desenvolvimento de substitutos cutâneos pela técnica de *electrospinning*, ligando à matriz desenvolvida uma proteína da membrana basal das células, a

fim de ser utilizado no tratamento e cura de pacientes com lesões cutâneas graves.

**[0009]** Além disso, outros produtos que mais se assemelham ao objetivo do presente invento possuem certas desvantagens em relação a ele como, por exemplo: uso de produtos animais, necessidade de reintervenção cirúrgica, impossibilidade de aplicação de células juntamente com o substituto, alto custo e necessidade de disponibilidade diária de mão-de-obra médica.

### **Sumário da invenção**

**[0010]** Dessa forma, a presente invenção provê uma solução para o problema encontrado no estado da técnica, que é o de substitutos tissulares, como, por exemplo, substitutos para a pele humana. Tal solução apresentada pela presente invenção possui evidentes e comprovadas vantagens como, por exemplo: custo de produção menor em relação aos substitutos atualmente disponíveis no mercado, matriz polimérica contendo fibras de tamanhos micrométricos e/ou nanométricos com possibilidade efetiva de incorporação de fatores de crescimento, matriz polimérica biocompatível e biodegradável (sem risco de rejeição ou perigo de contaminação por patógenos e não há necessidade de uma nova intervenção cirúrgica para retirada do material após determinado período), além da referida matriz polimérica permitir uma ligação efetiva (ligações covalentes) entre as fibras poliméricas e a laminina, em especial a laminina 332. Além disso, a incorporação de uma proteína da matriz extracelular, laminina, que ao ser incorporada mimetiza de forma mais próxima o nicho da célula, tornando o substituto tissular desenvolvido mais natural para a célula.

**[0011]** É um dos objetos da presente invenção um substituto tissular que compreende:

- a) matriz polimérica obtida pela técnica de eletrofiação; e
- b) proteína laminina ligada à referida matriz polimérica.

**[0012]** É outro objeto da presente invenção uma composição que compreende o substituto tissular conforme revelado pela presente invenção e pelo menos um fator de crescimento celular.

**[0013]** É outro objeto da presente invenção um processo de obtenção do substituto tissular conforme revelado pela presente invenção, processo este compreendendo as etapas de:

- a) misturar pelo menos um poliéster em combinação com pelo menos um solvente orgânico;
- b) submeter a dita mistura obtida na etapa a) à técnica de eletrofiação;
- c) hidrofilar a superfície das fibras poliméricas obtidas na etapa b); e
- d) adicionar laminina ao produto obtido na etapa c).

**[0014]** É mais outro objeto da presente invenção o uso de substituto tissular conforme revelado pela presente invenção por ser no preparo de uma composição para regeneração tecidual.

**[0015]** É mais outro objeto da presente invenção um processo de regeneração tecidual que compreende a etapa de contatar o substituto tissular conforme revelado pela presente invenção e/ou a composição conforme revelada pela presente invenção com pelo menos um tecido *ex-vivo*.

**[0016]** Ainda, o conceito inventivo a todos os contextos de proteção reivindicados é o substituto tissular contendo laminina.

#### **Descrição das Figuras**

**[0017]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

**[0018]** A Figura 1 refere-se a matrizes de PDLLA, mostrando os diferentes tipos de fibras conforme indicados a seguir: a) fibras finas, com diâmetro médio de 574 nm; b) fibras grossas, com diâmetro médio de 4,58 micrometros; c) mistura de ambas as fibras no mesmo *scaffold* (*scaffold* sendo entendido como arcabouço).

**[0019]** A Figura 2 apresenta a Matriz de PDLLA em diferentes situações, conforme indica-se a seguir: a) antes da hidrólise da superfície; b) matriz hidrolisada; e c) matriz hidrolisada e com a proteína laminina ligada covalentemente à superfície.

**[0020]** A Figura 3 mostra a análise de ângulo de contato das matrizes de PDLLA, PDLLA hidrolisadas (PDLLA/NaOH) e PDLLA com a ligação da laminina (PDLLA/Lam)

**[0021]** A Figura 4 mostra a ligação da laminina nas matrizes de PDLLA através da técnica de imunofluorescência com destaque para: a) ligação da proteína laminina na matriz de PDLLA; b) Controle negativo, com omissão do anticorpo primário (anti-laminina).

**[0022]** A Figura 5 mostra o teste de adesão celular avaliado nos dias em que as CTMs (grupos 1, 3, 4 e 5) e os queratinócitos (restante dos grupos) foram semeados. Os resultados são apresentados como média±erro padrão.

**[0023]** A Figura 6 mostra um ensaio de viabilidade celular avaliado em 7 dias, 14 dias e 21 dias após a semeadura celular. Os resultados são apresentados como média±erro padrão. As letras acima das barras correspondem a comparações com o grupo controle, enquanto o símbolo # corresponde a comparações entre os grupos de biomateriais. As comparações foram feitas em cada dia de análise.

**[0024]** A Figura 7 mostra fotos da análise histológica das matrizes de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, em que as CTMs e os queratinócitos foram co-cultivados. Os *scaffolds* foram corados com hematoxilina e eosina.

**[0025]** A Figura 8 mostra fotos de análises por fluorescência mostrando o co-cultivo de CTMs (coradas em vermelho com o reagente Mini-26) e queratinócitos. O núcleo de todas as células aparece em azul devido à coloração com DAPI.

**[0026]** A Figura 9 mostra um gráfico do tamanho médio de lesão após 9 dias da cirurgia com remoção total de pele.

**[0027]** A Figura 10 mostra fotos das lesões cutâneas dos animais 9 dias após a cirurgia. A) Controle lesão, B) PDLLA/Lam, C) PDLLA, D) PDLLA/Lam + células e E) PDLLA + células. As setas indicam a presença dos biomateriais. A barra de escala corresponde a 1 cm.

**[0028]** A Figura 11 mostra fotos do leito das lesões cutâneas após 9 dias da cirurgia. A) Controle lesão, B) PDLLA/Lam, C) PDLLA, D) PDLLA/Lam + células e E) PDLLA + células. A barra de escala corresponde a 1 cm.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0029]** É um dos objetos da presente invenção um substituto tissular que compreende:

- a) matriz polimérica obtida pela técnica de eletrofiação; e
- b) proteína laminina ligada à referida matriz polimérica.

**[0030]** Em uma concretização, a matriz polimérica é de poli(ácido D,L-láctico).

**[0031]** Em uma concretização, a matriz polimérica obtida pela técnica de eletrofiação (dita técnica também chamada neste pedido de patente de *electrospinning*) possui fibras poliméricas de diâmetro na faixa de 550 nm a 5,0 µm.

**[0032]** Em uma concretização, a matriz polimérica obtida pela técnica de eletrofiação (dita técnica também chamada neste pedido de patente de *electrospinning*) possui fibras poliméricas de diâmetro na faixa de 574 nm a 4,58 µm.

**[0033]** Em uma concretização, a matriz polimérica obtida pela técnica de eletrofiação (dita técnica também chamada neste pedido de patente de *electrospinning*) possui fibras poliméricas de diâmetro igual a 574 nm e/ou igual a 4,58 µm.

**[0034]** Em uma concretização, a laminina é a laminina 332.

**[0035]** Em uma concretização, a laminina 332 está ligada covalentemente à matriz polimérica.

**[0036]** É outro objeto da presente invenção uma composição que compreende o substituto tissular conforme revelado pela presente invenção e pelo menos um fator de crescimento celular.

**[0037]** Em uma concretização, o fator de crescimento celular é selecionado do grupo consistindo de: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de

Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Transformação (TGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Fator de Crescimento Nervoso (NGF).

**[0038]** É outro objeto da presente invenção um processo de obtenção do substituto tissular conforme revelado pela presente invenção, processo este compreendendo as etapas de:

- a) misturar pelo menos um poliéster em combinação com pelo menos um solvente orgânico;
- b) submeter a dita mistura obtida na etapa a) à técnica de eletrofiação;
- c) hidrofilar a superfície das fibras poliméricas obtidas na etapa b);  
e
- d) adicionar laminina ao produto obtido na etapa c).

**[0039]** Em uma concretização, a hidrofilação da etapa c) é com solução de hidróxido de sódio.

**[0040]** Em uma concretização, a hidrofilação da etapa c) é realizada com imersão das fibras poliméricas obtidas na etapa b) em hidróxido de sódio nas concentrações de 0,5M, 0,75M e de 1M e em quatro diferentes tempos de imersão – 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos para cada concentração de hidróxido de sódio.

**[0041]** Em uma concretização, o dito processo compreende adicionalmente a etapa de secagem das fibras poliméricas e posterior adição de solução de etil (dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) a uma concentração de 5 mg/mL (m/v) em água destilada.

**[0042]** Em uma concretização, a laminina é a laminina 332.

**[0043]** Em uma concretização, a laminina 332 está em uma concentração de 10µg/mL em solução tampão de fosfato.

**[0044]** É mais outro objeto da presente invenção o uso de substituto tissular conforme revelado pela presente invenção por ser no preparo de uma composição para regeneração tecidual.

- [0045]** Em uma concretização, a composição compreende laminina 332.
- [0046]** Em uma concretização, a regeneração é em tecido cutâneo.
- [0047]** Em uma concretização, a regeneração é em lesões do tecido cutâneo.
- [0048]** Em uma concretização, a regeneração é em lesões do tecido cutâneo causada por doenças cutâneas, como vitiligo, queloides, psoríase e nevos (pintas) e por queimaduras.
- [0049]** Em uma concretização, a composição adicionalmente compreende pelo menos um fator de crescimento celular.
- [0050]** Em uma concretização, o fator de crescimento celular é selecionado do grupo consistindo de: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Transformação (TGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Fator de Crescimento Nervoso (NGF).
- [0051]** É mais outro objeto da presente invenção um processo de regeneração tecidual que compreende a etapa de contatar o substituto tissular conforme revelado pela presente invenção e/ou a composição conforme revelada pela presente invenção com pelo menos um tecido *ex-vivo*.
- [0052]** Como principais aplicações se destaca o uso como substituto cutâneo em caso de pacientes com extensas lesões de pele e queimaduras, como curativo tissular em caso de lesões menores e mais superficiais, a utilização em testes de sensibilidade em cosmetologia no lugar de animais e também como auxiliar no tratamento de doenças cutâneas, como epidermólise bolhosa, por exemplo.
- [0053]** As matrizes de nanofibras ou microfibras preparadas pelo método de *electrospinning* apresentam diversas características peculiares. Por esse método, as fibras formadas mimetizam a estrutura da matriz extracelular, em termos de variabilidade de diâmetros de fibras, topologia e textura das fibras e, de modo limitado, também em termos de propriedades mecânicas. A conformação arquiteônica, com fibras entrelaçadas de modo a formar um

arranjo espacial poroso e interconectado, muito semelhante à encontrada no tecido humano, é formada pelas nanofibras ou microfibras que possibilitam a utilização do substituto ou curativo tissular como um suporte para o crescimento de células-tronco ou células diferenciadas, acelerando assim a regeneração dos tecidos. A utilização de células específicas, do próprio paciente ou de células-tronco, além de acelerar a regeneração dos tecidos evita a rejeição dos enxertos.

**[0054]** A ligação da proteína laminina-332 traz vantagens, já que as lamininas são as principais proteínas na lâmina basal (uma das camadas da membrana basal), uma base de rede proteica para a maioria das células e órgãos. Influenciam a diferenciação celular, migração e adesão, bem como fenótipo e sobrevivência. São proteínas triméricas que contêm uma cadeia  $\alpha$ (alfa), uma cadeia  $\beta$ (beta), e um cadeia  $\gamma$ (gama). As moléculas de laminina são nomeadas de acordo com a sua composição em cadeia. Em especial a laminina 332 é composta das cadeias alfa3, beta3 e gama2. É expressa na pele, na mama e em outros tecidos, em que está envolvida na formação de hemidesmosomas e a cicatrização de feridas. Lamininas defeituosas podem causar má formação muscular, levando a uma forma de distrofia muscular, epidermólise bolhosa e defeitos de filtração nos rins (síndrome nefrótica).

**Processo de eletrofiação (eletrofiação também sendo denominado de *electrospinning* no presente pedido de patente)**

**[0055]** O processo de eletrofiação (*electrospinning*) funciona pelo princípio eletrostático. O aparelho é composto basicamente por uma seringa com agulha, um eletrodo coletor (normalmente uma placa de metal), uma fonte de campo elétrico e uma bomba peristáltica. A solução a ser eletrofiada é impulsionada ao sistema através da agulha da seringa pela ação da bomba peristáltica. Essa solução é então submetida a uma diferença de tensão elétrica presente entre a agulha e a placa metálica. A voltagem elétrica gerada causa uma deformação na gota polimérica, gerando um cone na ponta da agulha (cone de Taylor). Esse desequilíbrio gerado na solução pela aplicação da voltagem elétrica faz com que fios de solução saiam em direção à placa

coletora. No caminho, o solvente na solução evapora-se e, no final do processo, os filamentos sólidos contínuos são obtidos (Greiner e Wendorff, 2007).

**[0056]** Embora pareça à primeira vista um método fácil, o processo depende de uma multiplicidade de parâmetros moleculares, de processamento e técnicos. Isto inclui: (i) os parâmetros ambientais, tais como temperatura da solução, umidade e velocidade do ar na câmara de ES; (ii) as propriedades da solução, tais como a elasticidade, viscosidade, condutividade e tensão superficial; e (iii) as variáveis técnicas, como a distância entre o eletrodo e a ponta da agulha, o potencial elétrico, a taxa de fluxo (velocidade da solução), o peso molecular dos polímeros escolhidos, a geometria da placa coletora, entre outros (Doshi e Reneker, 1995; Greiner e Wendorff, 2007).

**[0057]** Por essa técnica, são obtidos *scaffolds* que mimetizam muito intimamente a matriz extracelular das células em termos químicos e dimensionais. Como pode ser observado pelas fotos das matrizes por MEV (abaixo), percebe-se as mesmas são formadas por fibras. Essas fibras mimetizam a matriz extracelular (MEC) em termos de suas proteínas estruturais, como colágeno e elastina. Dessa forma, as células reconhecem esse ambiente fibrilar como sendo semelhante ao seu nicho celular. Além disso, através da incorporação de moléculas bioativas, algo factível pela técnica de *electrospinning*, essas fibras tornam-se ainda mais semelhantes à MEC. Através dessa técnica podem ser incorporados fatores de crescimento de acordo com o tipo de tecido que se quer regenerar. Também podem ser incorporadas proteínas, como a laminina, que é uma proteína encontrada na matriz extracelular das células e sabe-se que é responsável pelo ancoramento, migração, proliferação, etc, das células.

#### **Proteína laminina 332 e matriz extracelular (abreviadamente, MEC)**

**[0058]** A MEC é uma malha de fibras, que variam de dezenas a milhares de nanômetros em diâmetro, formando um arcabouço celular com alta porosidade. Ela é composta por proteínas estruturais, incluindo colágenos, elastina, e proteínas não-estruturais, como a fibronectina, laminina, tenascina,

etc. Outros componentes importantes da MEC incluem as integrinas, fatores de crescimento e um grupo de metaloproteinases (Kular, Basu e Sharma, 2014).

**[0059]** As células, nesse contexto, encontram-se em um ambiente tridimensional estruturalmente complexo, repleto de um conjunto de informações exclusivas para elas. Dessa forma, a mimetização destas condições *in vitro* é necessária para um maior entendimento das funções celulares, assim como a sua utilização na construção e reparo de órgãos e tecido doentes (Wheeldon *et al.*, 2011).

**[0060]** Com esse intuito, as lamininas são moléculas glicoprotéicas compostas de 3 cadeias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ligadas por pontes de dissulfeto (Sugawara *et al.*, 2008). Essas proteínas encontram-se apenas em membranas basais e ligam-se a integrinas específicas, bem como a algumas glicoproteínas de células endoteliais, neurônios e células do músculo esquelético, influenciando o reconhecimento e a diferenciação celular. Trabalhos demonstram que essa molécula está relacionada não apenas na aderência celular, mas também no espalhamento, na migração, e na estimulação de taxas de crescimento celular, angiogênese, cicatrização e crescimento neuronal (Boccafoschi *et al.*, 2012; Hozumi *et al.*, 2012; Mammadov *et al.*, 2012).

**[0061]** Dentre as proteínas da família laminina, a laminina-332 (isoforma  $\alpha3\beta3\gamma2$ ) (Figura 3), também conhecida como laminina 5, é a principal proteína encontrada na membrana basal da pele (Chiang *et al.*, 2011), sendo fundamental para a migração de queratinócitos na recuperação de lesões cutâneas (Sugawara *et al.*, 2008; Domogatskaya, Rodin e Tryggvason, 2012). Já foi demonstrado anteriormente que a laminina 5 possui forte influência sobre a adesão dos queratinócitos à membrana basal por meio de complexos protéicos de hemidesmossomos (Ghohestani *et al.*, 2001).

**[0062]** Logo, por se tratar de um substituto cujo intuito de fabricação é a regeneração de tecidos, especialmente a pele, acredita-se que essa proteína seja fundamental para guiar as células de forma que se organizem de maneira ordenada, a fim de formar um novo tecido funcional.

### **Produção da matriz extracelular (MEC)**

**[0063]** Para a produção da matriz, suporte ou molde, inicialmente prepara-se uma solução polimérica, cujas concentrações do polímero podem variar desde 1% a 40%. Essa solução polimérica é feita através da pesagem do polímero (poliésteres, todos biodegradáveis e biocompatíveis) em balança analítica. Em seguida, mede-se o volume de solvente, que também é adicionado à solução. Os solventes utilizados são os solventes orgânicos (por exemplo, 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol, diclorometano, clorofórmio, dimetilformamida, entre outros). Essa solução fica sob agitação em agitador magnético por no mínimo 24 horas e, após isso, a mesma pode ficar sob refrigeração até o uso. Para a produção dessas matrizes, utiliza-se a técnica de *electrospinning*, variando diversos parâmetros, tais como voltagem aplicada, distância entre agulha e coletor, fluxo, diâmetro da agulha aplicada, entre outros. Essa variação de parâmetros possibilita a produção de matrizes, suportes ou moldes muito semelhantes à tecidos encontrados no corpo humano, onde as fibras de colágeno variam de 50 a 500 nm. Para o desenvolvimento dessa matriz foram realizadas micrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para verificação da distribuição do diâmetro das fibras de ambos substitutos produzidos.

**[0064]** Como pode ser observado na figura 1, esse substituto cutâneo foi construído com dois diferentes diâmetros de fibra. O menor na superfície da matriz, com diâmetro de 574 nm, e o maior na parte mais inferior do *scaffold*, com diâmetro de 4,58  $\mu\text{m}$ , propiciando a tridimensionalidade necessária para essas estruturas.

**[0065]** Para que proteínas como a laminina possam ser ligadas à estrutura do *scaffold*, faz-se necessária a hidrofilição da superfície das fibras das matrizes. Para isso, diferentes métodos químicos e/ou físicos podem ser empregados, entre eles o emprego de soluções alcalinas.

#### **Hidrofilição da superfície das fibras das matrizes**

**[0066]** Para a hidrólise (hidrofilição) da superfície dos biomateriais, três diferentes concentrações de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) foram testadas, 0,5M, 0,75M e 1M, em quatro diferentes tempos de imersão: 10, 15,

30 e 60 minutos para cada concentração. Os *scaffolds* foram imersos em solução de NaOH e, após o tempo determinado, a solução foi retirada. Então, quatro lavagens sucessivas com água Milli-Q foram realizadas (Kim *et al.*, 2010; Zander *et al.*, 2012). Em seguida, os *scaffolds* foram secos em estufa a vácuo por 24 horas à temperatura de 40°C.

**[0067]** Essa hidrofilição expõe grupamentos de ácidos carboxílicos e álcoois o que faz com que a superfície se torne mais hidrofílica (maior afinidade pela água) e, dessa forma, torna possível a ligação covalente (ligação peptídica) da proteína laminina.

**[0068]** Após a realização da hidrólise e secagem das matrizes, solução de etil (dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) a uma concentração de 5 mg/mL (m/v) em água destilada foi colocada sobre as mesmas. Essa solução foi deixada por um período de 60 minutos à temperatura ambiente em contato com as matrizes. A seguir, uma solução de laminina (Laminina 332, BioLamina®) 10µg/mL em solução tampão de fosfato (PBS) foi adicionada aos *scaffolds* (Rho *et al.*, 2006; Boccafoschi *et al.*, 2012). A solução de laminina foi mantida por 24 horas a 4°C.

**[0069]** Logo, após a hidrólise da superfície, verificou-se a estrutura dessas matrizes. A ligação da laminina também foi avaliada por MEV (conforme já indicada na Figura 2). A análise de ângulo de contato, que mede a hidrofilição também foi verificada (conforme já indicada na Figura 3), demonstrando que a matriz de PDLLA com laminina foi a que se apresentou a mais hidrofílica após 30 segundos. Na Figura 4, através da técnica de imunofluorescência, verifica-se a ligação da laminina nas matrizes de PDLLA (em vermelho).

**[0070]** Para utilização das matrizes, suportes ou moldes, métodos de esterilização devem ser utilizados, entre os quais óxido de etileno, luz ultravioleta, etc. A presente invenção será usada como substituto, em casos de pacientes que necessitam de regeneração de tecidos. Para isso, estudos de interação de células-tronco humanas e queratinócitos humanos com os substitutos foram realizados, dentre eles: adesão celular e viabilidade celular,

através de um ensaio utilizando WST-8 e histologia, através de coloração com hematoxilina e eosina.

**[0071]** Os resultados mostraram que as matrizes produzidas com a ligação da proteína laminina apresentaram uma melhora na adesão celular em comparação ao grupo PDLLA (matriz formada somente pelo polímero) e PDLLA/NaOH (matriz formada pelo polímero e cuja superfície foi hidrolisada). Os ensaios de proliferação mostraram que o grupo PDLLA/Lam (matriz produzida com o polímero, hidrolisada e com a ligação da proteína) apresentou uma maior número de células metabolicamente ativas, em comparação aos outros grupos analisados. Dessa forma, conclui-se que a incorporação da proteína nos *scaffolds* mostrou-se superior no suporte para adesão celular e proliferação. Através da análise histológica foi possível verificar a presença das células em todos os biomateriais, ocupando todas as suas estruturas, tridimensionalmente.

**[0072]** A presente invenção pode também ser usada como curativo, em casos de pacientes queimados ou em lesões por traumas, entre outros apresentando vantagens, como: menor rejeição por parte do paciente por não utilizar materiais provenientes de outro ser humano ou animal; possibilidade de cultivo de células-tronco ou células diferenciadas do próprio paciente ou não sobre as matrizes, acelerando a regeneração; degradação da matriz enquanto ocorre a recuperação do tecido lesado, dando suporte ao tecido e ao mesmo tempo em que não interfere na sua recuperação; não há risco de transmissão de doenças virais; e, propriedades arquitetônicas e mecânicas muito semelhantes à matriz extracelular natural do indivíduo.

#### **Testes e resultados experimentais com o substituto tissular desenvolvido**

**[0073]** Com relação às análises biológicas, a adesão celular foi melhor nos *scaffolds* de PDLLA/Lam, com exceção do grupo 8, quando comparado aos outros grupos (Figura 5). O grupo PDLLA/Lam+CTMs+K demonstrou a melhor adesão celular. Houve diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,001$ ).

**[0074]** A análise viabilidade celular foi avaliada 7, 14 e 21 dias após a semeadura dos queratinócitos. No dia 7 de análise, a absorvância para o grupo

3 foi de  $1,148 \pm 0,411$ , para o grupo 4 foi de  $1,380 \pm 0,501$  e para o grupo 5 foi de  $1,990 \pm 0,255$ . No dia 14, a absorvância para os grupos 3, 4 e 5 foi de  $1,032 \pm 0,169$ ,  $0,755 \pm 0,016$ , and  $1,636 \pm 0,313$ , respectivamente. No dia 21, a absorvância para o ensaio de viabilidade celular foi de  $2,204 \pm 0,317$ ,  $1,437 \pm 0,024$  and  $2,811 \pm 0,477$ , respectivamente para os grupos 3, 4 e 5. Os grupos controle (1 e 2) apresentaram a maior absorvância quando comparado aos outros grupos, representando um maior número de células nos poços das placas plásticas (Figura 6).

**[0075]** Para a análise estatística, uma comparação foi feita entre os grupos em cada dia de análise em termos de viabilidade celular. No dia 7, quando comparados somente os grupos com *scaffolds* e células, o grupo 3 foi estatisticamente diferente do grupo 5 ( $p < 0,001$ ). No dia 14, o grupo PDLLA/Lam+CTMs+K foi melhor que o grupo PDLLA/NaOH+CTMs+K ( $p < 0,001$ ). No dia 21, os grupos 3 e 5 foram similares entre si ( $p = 1,000$ ), mas mostraram-se diferentes do grupo 4. Em todos os dias de análise, o grupo 1 (somente CTMs) teve a melhor absorvância ( $p < 0,001$ ) para todas as comparações, com exceção do dia 14, em que o grupo 3 não mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo 1 ( $p = 0,245$ ). O grupo 2 (somente queratinócitos semeados nos poços de cultura) foi comparável aos grupos com *scaffolds* e células, em termos de absorvância, em todos os dias de análise.

**[0076]** Pelas lâminas de histologia, pode-se visualizar perfeitamente que as células ocuparam toda a estrutura dos biomateriais em todos os grupos. Um epitélio estratificado é visível no dia 7 de análise nos grupos PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam (Figura 7). A Figura 8 mostra a presença de ambos os tipos de células, células-tronco mesenquimais e queratinócitos, nas matrizes em todo o período de análise, para todos os *scaffolds* testados.

### **Experimentação *in vivo***

**[0077]** Foram realizadas cirurgias em 28 animais e nenhum deles apresentou sinais de infecção durante todo o período de análise. Não houve perda de nenhum animal.

**[0078]** Para a medida do tamanho médio das lesões após 9 dias da cirurgia do animais, utilizou cinco grupos: 1) controle lesão, 2) PDLLA/Lam, 3) PDLLA, 4) PDLLA/Lam + células e 5) PDLLA + células. Inicialmente todos os animais foram submetidos ao mesmo padrão de lesão, com 1 cm<sup>2</sup> de área de pele total retirada. Após 9 dias, os animais foram eutanasiados e através de fotografias foram feitas medidas da área da lesão com auxílio do software ImageJ 1.38x. Como pode ser verificado na Figura 9, as médias e desvios padrão para os grupos 1, 2, 3, 4 e 5 foram 0,319±0,040 cm<sup>2</sup>, 0,315±0,056 cm<sup>2</sup>, 0,439±0,117 cm<sup>2</sup>, 0,342±0,110 cm<sup>2</sup>, 0,411±0,170 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos (p=0,296), embora perceba-se que os grupos 2 e 4 (*scaffolds* de PDLLA/Lam sem e com células, respectivamente) tiveram uma maior redução da área lesada quando comparadas aos grupos 3 e 5 (*scaffolds* de PDLLA).

**[0079]** Nos grupos onde as CTMs e os queratinócitos foram semeados nas matrizes ainda foi possível visualizar os *scaffolds* íntegros sobre a lesão após 9 dias da cirurgia. Em 3 de 6 animais do grupo 3 também foi possível visualizar pedaços de *scaffolds* (Figura 10).

**[0080]** Com relação ao aspecto visual do leito da lesão, o grupo 3 foi o que apresentou o melhor aspecto visual, sem a formação de uma ferida grosseira. Já o grupo 1, foi o que apresentou o pior aspecto de leito de lesão (Figura 11). Além disso, a área retirada para as análises compreenderam somente o local da ferida, dessa forma, o grupo 2 foi o que apresentou a menor contração da ferida, já que após a retirada da área lesionada, foi o que apresentou o menor tamanho de lesão (Figura 11).

**[0081]** Para todos os casos, o foco é que a matriz, suporte ou molde irá se degradar enquanto a regeneração tecidual ocorrer. Além disso, também existe a possibilidade de utilização desse material em escaras de pacientes há muito tempo impossibilitados de movimentarem-se. Também poderá ser utilizada em doenças cutâneas, como vitiligo, quelóides, psoríase e nevos (pintas).

**[0082]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

1. SUBSTITUTO TISSULAR **caracterizado** por compreender:
  - a) matriz polimérica obtida pela técnica de eletrofiação; e
  - b) proteína laminina ligada à referida matriz polimérica
2. SUBSTITUTO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela matriz polimérica ser de poli(ácido D,L-láctico)
3. SUBSTITUTO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pela laminina ser a laminina 332
4. COMPOSIÇÃO **caracterizada** por compreender o substituto tissular conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e pelo menos um fator de crescimento celular
5. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SUBSTITUTO TISSULAR conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 **caracterizado** por compreender as etapas de:
  - a) misturar pelo menos um poliéster em combinação com pelo menos um solvente orgânico;
  - b) submeter a dita mistura obtida na etapa a) à técnica de eletrofiação;
  - c) hidrofilar a superfície das fibras poliméricas obtidas na etapa b); e
  - d) adicionar laminina ao produto obtido na etapa c)
6. USO DE SUBSTITUTO TISSULAR conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 **caracterizado** por ser no preparo de uma composição para regeneração tecidual
7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela composição compreender laminina 332
8. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela composição adicionalmente compreender pelo menos um fator de crescimento celular
9. PROCESSO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL **caracterizado** por compreender a etapa de contatar o substituto tissular conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e/ou a composição conforme definida na reivindicação 4 com pelo menos um tecido *ex-vivo*

**Figuras**

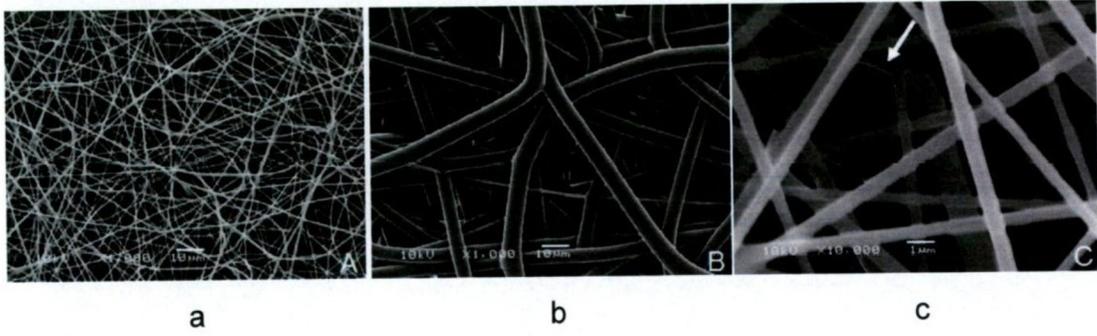


Figura 1

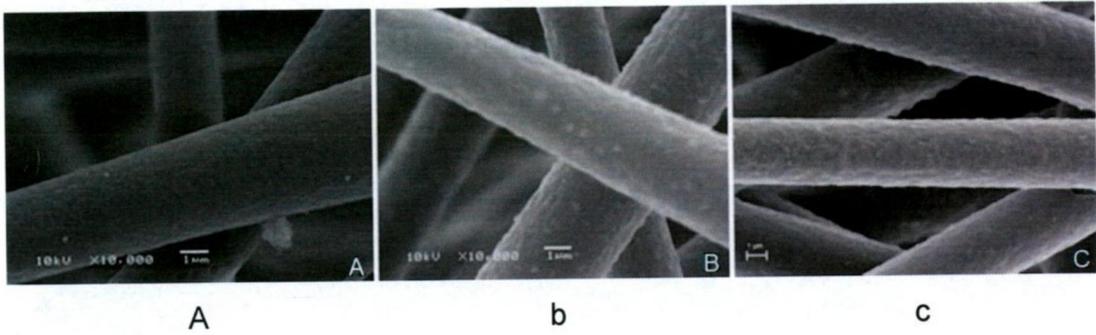


Figura 2

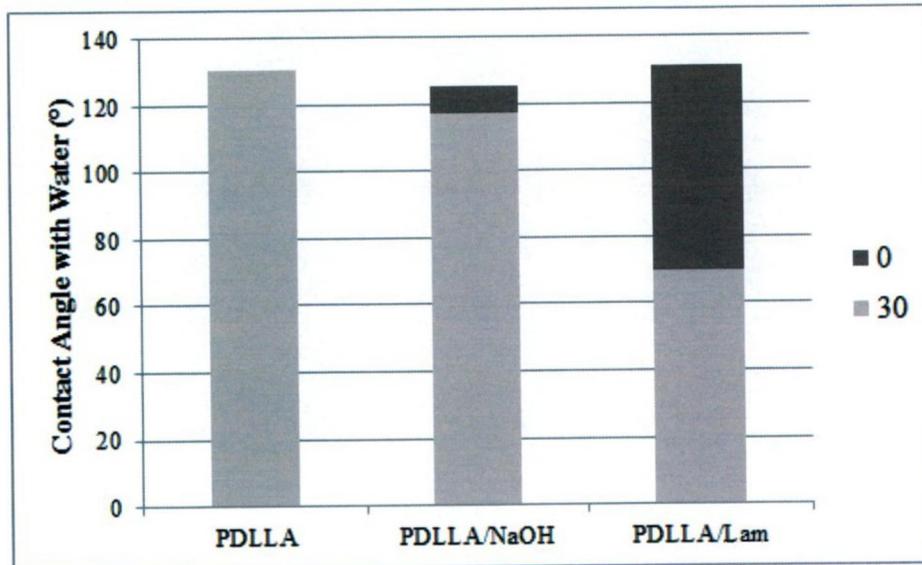


Figura 3

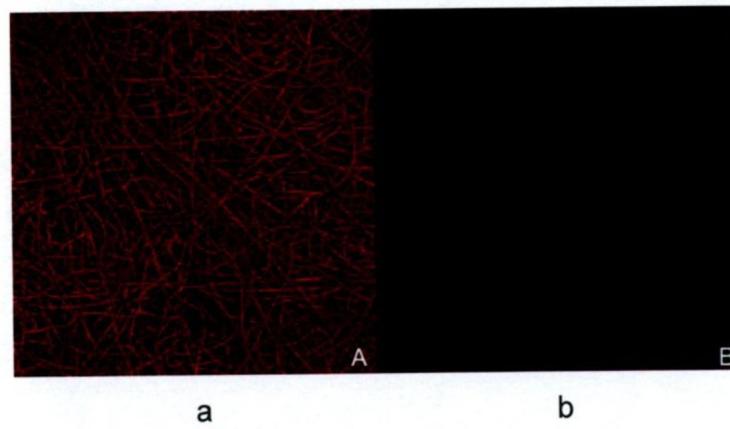


Figura 4

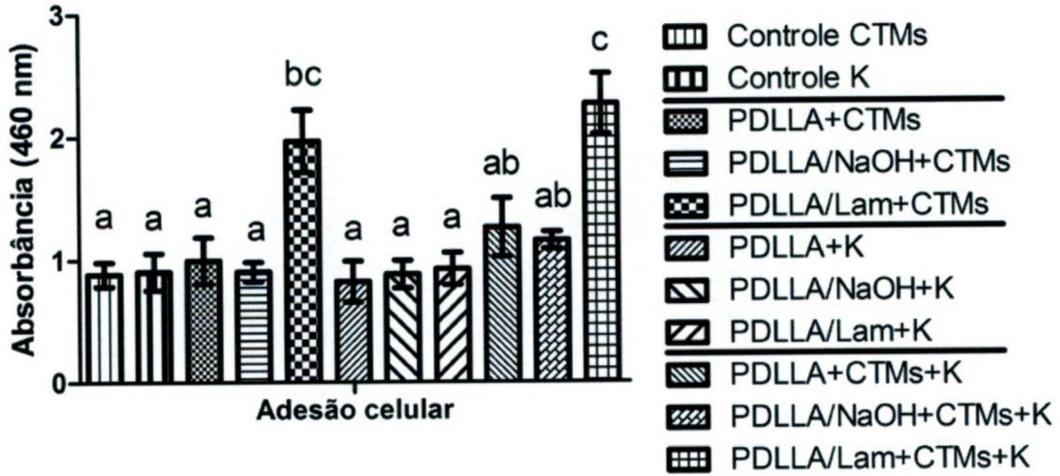


Figura 5

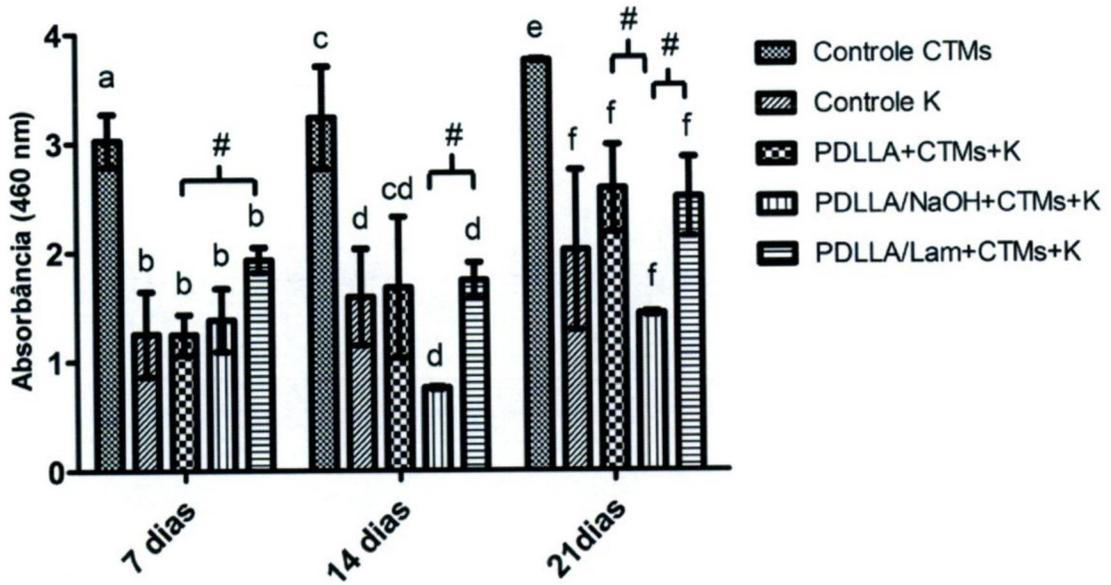


Figura 6

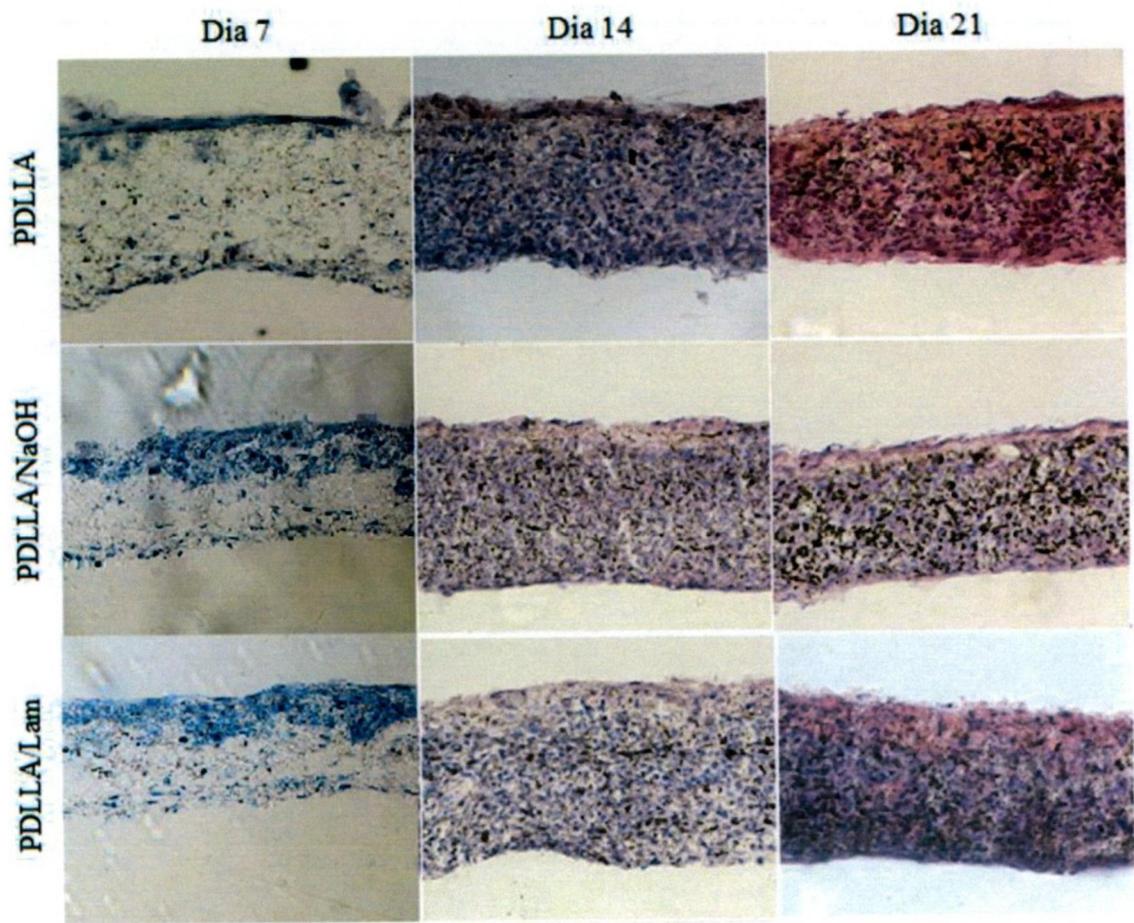


Figura 7

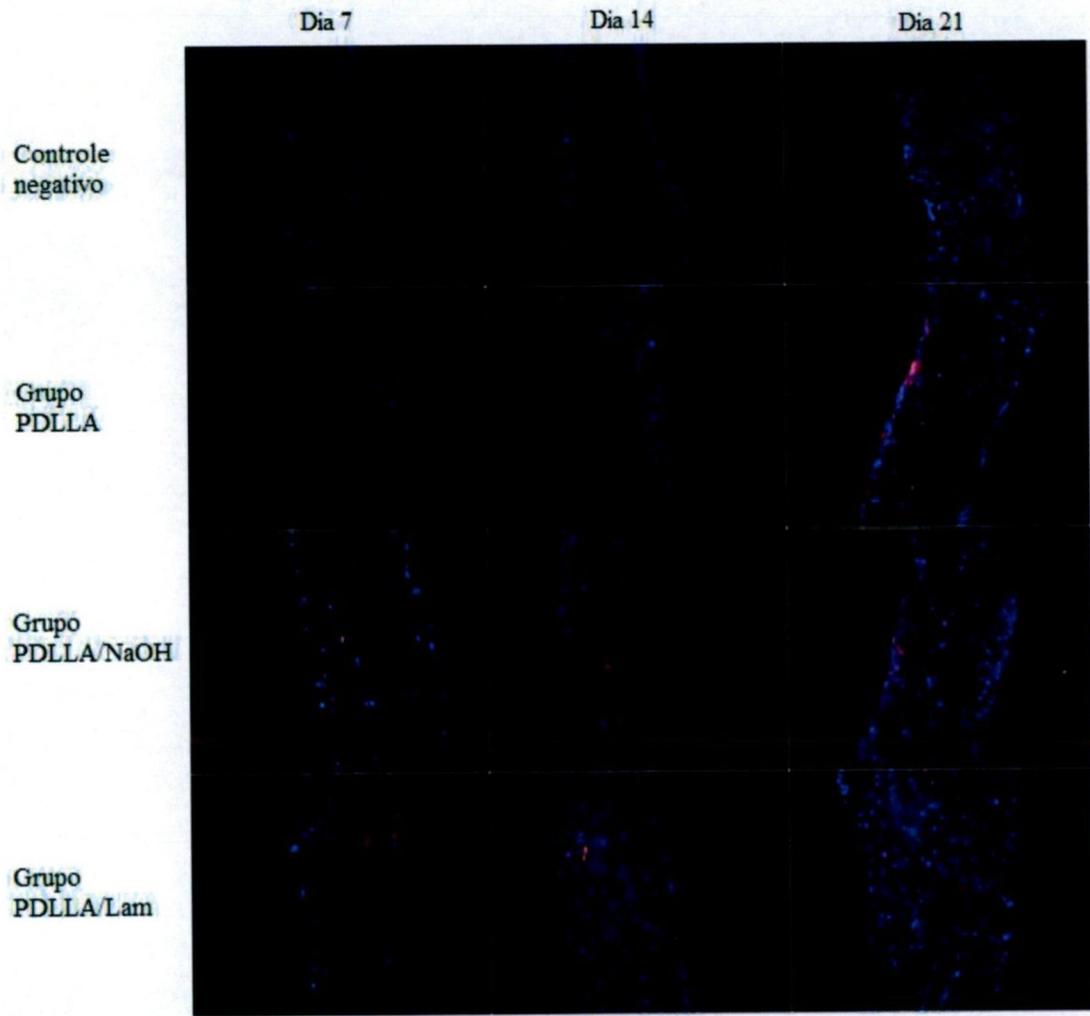


Figura 8

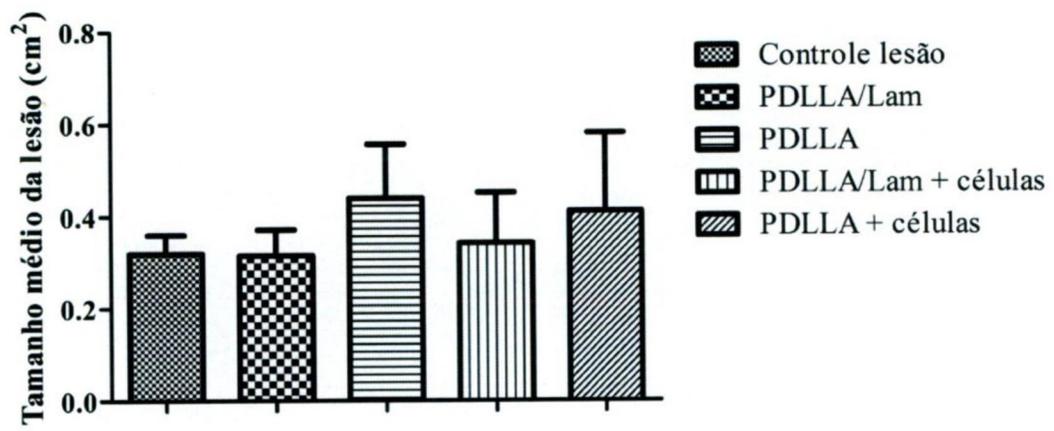


Figura 9



Figura 10

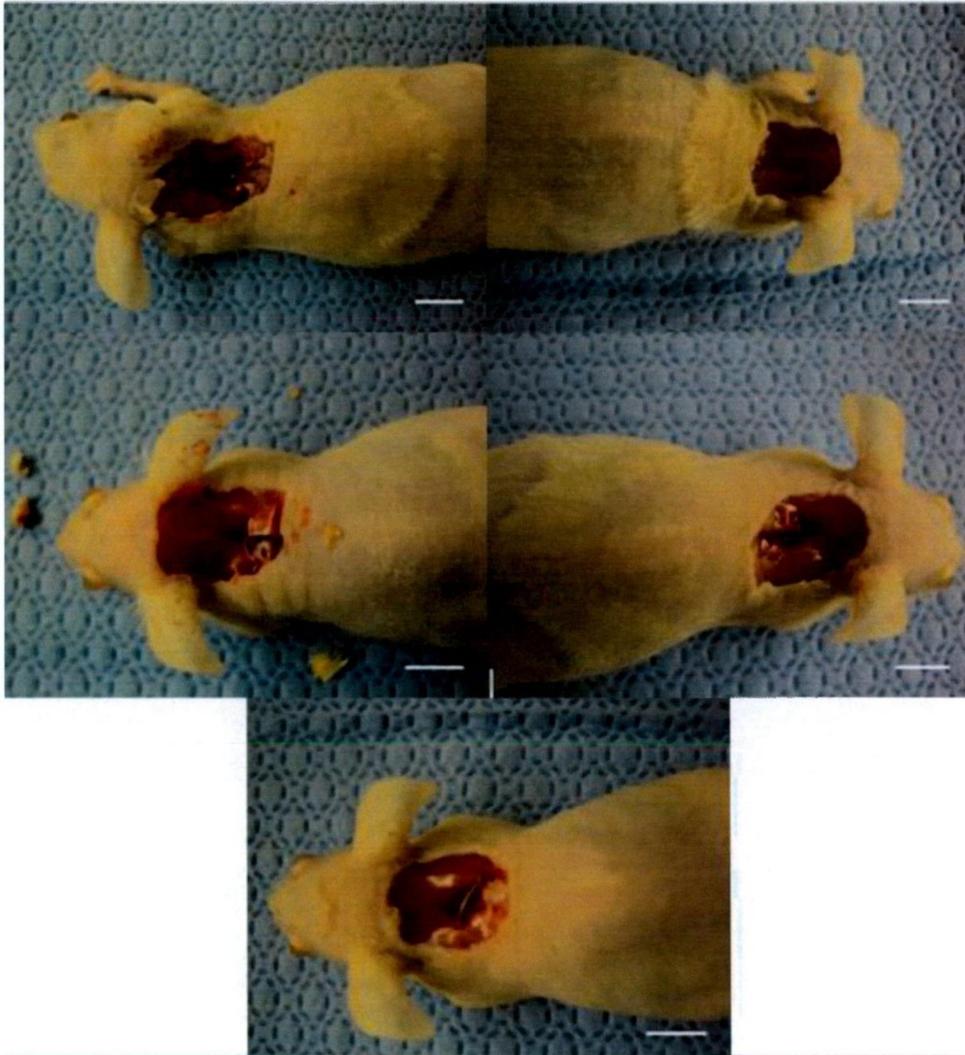


Figura 11

**Resumo****SUBSTITUTO TISSULAR, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, USO DE  
SUBSTITUTO TISSULAR E PROCESSO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL**

A presente invenção refere-se a um substituto tissular que compreende a proteína laminina ligada a uma matriz polimérica, à composição que compreende o dito substituto tissular e ao processo de obtenção do referido substituto tissular. A presente invenção também se refere ao uso de substituto tissular no preparo de uma composição para regeneração tecidual e a um processo de regeneração tecidual compreendendo a etapa de contatar o dito substituto tissular com pelo menos um tecido ex-vivo. A presente invenção situa-se nos campos da Química, da Farmácia, da Medicina e da Engenharia de Biomateriais.