



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

(21) PI 1107303-9 A2



* B R P I 1 1 0 7 3 0 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/12/2011
(43) Data da Publicação: 05/11/2013
(RPI 2235)

(51) Int.Cl.:
A61L 15/36
A61K 35/74
A61K 35/66
D04H 1/728

(54) Título: SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR

(73) Titular(es): Instituto de Pesquisa com Células-Tronco,
Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Daniela Steffens, Jorge Alberto Vieira Costa,
Michele Greque de Moraes, Patricia Helena Lucas Pranke

(57) Resumo: SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR. O objetivo da presente invenção é fornecer um substituto ou curativo tissular, onde matrizes, suporte são formados por nanofibras ou microfibras utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis incorporado à biomassa da Spirulina, visando resolver os problemas encontrados nos estados da técnicas.

SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR

Campo da invenção

A presente invenção é dirigida a produção de um substituto ou curativo tissular, formado de fibras nanométricas ou micrométricas produzidas através da técnica de *electrospinning*, com a incorporação da biomassa da *Spirulina*,
5 que mimetizam a matriz extracelular natural do organismo.

Estado da técnica

O processo de reconstituição tissular existe para restaurar a integridade física e funcional de um tecido após uma lesão.

10 Nos casos de lesões extensas e profundas usualmente faz-se necessária a técnica cirúrgica com autoenxertos, aloenxertos ou xenoenxertos, onde tecidos de sítios doadores do próprio indivíduo afetado, tecidos cadavéricos humanos ou tecidos de espécies distintas, respectivamente, são transplantados para a região afetada. Contudo as técnicas citadas apresentam
15 consideráveis desvantagens. Dentre estas desvantagens podemos citar o fato de os autoenxertos serem inviáveis em caso de lesões extensas e profundas devida a falta de área doadora, e pela manifestação de dor no local de coleta. No caso dos aloenxertos e dos xenoenxertos, os mesmos apresentam como principais desvantagens a possibilidade de transmissão de doenças e o
20 surgimento de reação imune.

Os materiais biológicos atualmente utilizados como substitutos tissulares, são produzidos de acordo com a fisiologia do local onde pretende-se

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*.

5 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.

10 Além disso, até o presente momento não são comercializados substitutos aos quais possam ser integradas células-tronco, 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
15 para retirada de tecido do próprio paciente e implantação sobre o implante. Outros problemas encontrados nos atuais substitutos cutâneos, como baixa vascularização, cicatrização, ausência de componentes celulares diferenciados, déficit de suporte mecânico e de manuseio, entre outros ainda são freqüentes nos atuais equivalentes disponíveis, tomando-se necessário o
20 desenvolvimento de substitutos que minimizem ou eliminem essas desvantagens.

Descrição resumida da invenção

O objetivo da presente invenção é fornecer um substituto ou curativo tissular, onde matrizes, suportes ou moldes são formadas por nanofibras ou microfibras utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis incorporado à biomassa da *Spirulina*, visando resolver os problemas encontrados no estado da técnica.

Para atingir o objetivo acima, o substituto ou curativo tissular, contendo a microalga *Spirulina*, a qual possui propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas, serve, ao mesmo tempo, como um suporte e um molde para o crescimento de células-tronco, propiciando menor risco de infecções ao paciente.

Descrição resumida dos desenhos

A figura 1 ilustra a morfologia das fibras de PDLLA (A) e PDLLA/Sp (B).

A figura 2 ilustra a distribuição dos diâmetros das fibras dos substitutos desenvolvidos.

Figura 3 ilustra o teste de adesão celular utilizando 5 linhagens de células-tronco de rim de camundongo.

A figura 4 ilustra o teste de proliferação celular utilizando células-tronco de rim de camundongo.

A figura 5 ilustra o teste de citotoxicidade às células-tronco de rim de camundongo.

A figura 6 ilustra o animal com modelo de queimadura de 3º grau, com posterior

implantação do substituto cutâneo com células-tronco.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção consiste em um substituto ou curativo tissular a ser usado para regenerar um tecido lesado, o qual é uma matriz, suporte ou molde, formado de fibras nano ou micrométricas produzidas através da técnica de *electrospinning* com a incorporação da biomassa da *Spirulina* que mimetizam a matriz extracelular natural do organismo, podendo ainda ser produzido com a incorporação ou encapsulamento de fatores de crescimentos de células, tais como o *Vascular Endothelial Growth Factor* – (VEGF), *Epidermal growth factor* (EGF), *Fibroblast growth factor* (FGF), *Platelet derived growth factor* (PDGF), *Transforming growth factor* (TGF), *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Nerve Growth Factor* (NGF), entre outros, dependendo do local a ser regenerado, sendo o foco principal desse substituto a regeneração de pele, entretanto, podendo ser ampliada a outras aplicações.

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.

Micrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura foram feitas para análise da morfologia e diâmetro das fibras das matrizes produzidas. Nas matrizes de PDLLA foram obtidas fibras com morfologia homogênea, com

diâmetro de 276 ± 65.9 nm e tamanho médio de poro de $2,569\pm 1.279$ μm . As fibras de PDLLA/Sp mostraram diâmetro de fibra médio de 263 ± 82 nm e tamanho médio de poro de $2,395\pm 1,047$ μm

5 A conformação arquitetônica, 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
10 paciente ou de células-tronco, além de acelerar a regeneração dos tecidos evita a rejeição dos enxertos.

A incorporação da biomassa da *Spirulina*, agrega à matriz as propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas da microalga ao substituto tissular. Essa cianobactéria pertencente ao grupo *Cyanobacteriu*, possui
15 vitaminas, minerais, aminoácidos essenciais, carboidratos e enzimas, ácidos graxos essenciais, lipídios, complexo B, vitamina C e E e os químicos vegetais, tais como os carotenóides, clorofila e ficocianina. Devido a estes compostos, a matriz descrita no presente invento diminui as chances de infecção da lesão.

Para a produção da matriz, suporte ou molde, inicialmente prepara-se
20 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) e da biomassa da

microalga *Spirulina* (concentrações entre 0,1 a 40%) 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-hexafluorisopropanol, 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* (ou eletrofiação), 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, muito próximo ao alcançado com o presente invento, como pode ser observado no gráfico abaixo. Para o desenvolvimento dessa matriz foram realizadas micrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura para verificação da distribuição do diâmetro das fibras de ambos substitutos produzidos. Percebe-se que o substituto ao qual foi incorporado a microalga *Spirulina* possui uma distribuição mais ampla de mais semelhante à encontrada na matriz extracelular natural das células .

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 de rim de camundongos com os substitutos foram realizados, dentre eles: adesão celular; através da marcação das CTM com DAPI; 5 viabilidade celular, através de um ensaio utilizando MTT; e, citotoxicidade, através da dosagem da enzima Lactato Desidrogenase, liberada pelas células ao morrerem. Como resultados observou-se que a adesão dos grupos testados aos *scaffolds* foi estatisticamente diferente ao grupo controle (células cultivadas diretamente nas placas de cultivo) em 3 das 5 linhagens avaliadas. Contudo, as 10 matrizes de PDLLA/Sp mostraram maior similaridade de adesão ao controle comparado com as matrizes de PDLLA. Em relação ao ensaio de proliferação, embora a quantidade de células metabolicamente ativas dos grupos testes tenha sido mais baixo que do grupo controle, pode-se observar que as células proliferaram nas matrizes. Entretanto, antes houve uma queda no número de 15 células, provavelmente explicado pela saturação do espaço para proliferação, tendo sido a divisão celular retomada após esse decréscimo. Em relação à dosagem de LDH, os grupos testes foram semelhantes ao grupo controle e estatisticamente diferentes do grupo Triton (morte e liberação de LDH máximas), confirmando que os *scaffolds* não são citotóxicos

20 Os resultados mostraram que as matrizes produzidas com a incorporação da microalga brasileira *Spirulina* mostraram uma melhora na adesão celular em comparação ao grupo PDLLA. Os ensaios de proliferação e

citotoxicidade mostraram que o grupo PDLLA/Sp e PDLLA apresentaram comportamentos semelhantes ao grupo controle. Dessa forma, conclui-se que ambos os *scaffolds* são bons suportes para adesão celular e proliferação, com baixa toxicidade.

5 A presente invenção poderá 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 do próprio paciente ou não sobre as matrizes, acelerando a
10 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.

15 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), além da
20 possibilidade de utilização na regeneração óssea, de cartilagens, formação de vasos, lesões neurais, lesões de tendões e ligamentos, além de restauração da função da bexiga, ureteres, entre outros órgãos.

Além das vantagens alcançadas o presente substituto ou curativo tissular apresenta um custo menor em relação aos substitutos disponíveis atualmente no mercado, viabilizando sua maior utilização.

5 Deve ficar evidente aos conhecedores da técnica que a presente invenção pode ser configurada de muitas outras formas específicas sem apartar-se do espírito ou do escopo da invenção. Particularmente, deve-se compreender que a invenção pode ser configurada nas formas descritas.

10 Portanto, os exemplos e configurações presentes devem ser considerados como ilustrativos e não restritivos, e a invenção não deve ser limitada aos detalhes fornecidos neste documento, mas podem ser modificados dentro do escopo e equivalência das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, para regenerar um tecido lesado, **caracterizado** pelo fato de ser formado por fibras nanométricas ou micrométricas com a incorporação da biomassa da *Spirulina*.

2. **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de as matrizes serem formadas por nanofibras ou microfibras utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis.

3. **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de as matrizes formadas por nanofibras ou microfibras mimetizarem o tecido natural humano e sua matriz extracelular.

4 **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por as matrizes de nanofibras ou microfibras serem preparadas pelo método de *electrospinning*.

5. **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de conter concentrações de 0,1 a 40% da biomassa da *Spirulina*.

6. **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser produzido com a incorporação ou encapsulamento de fatores de crescimentos de células.

7. **“SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por degradar enquanto a regeneração tecidual ocorrer.

8. “**SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR**”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser utilizado em doenças cutâneas, regeneração óssea, de cartilagens e na formação de vasos, lesões neurais, lesões de tendões e ligamentos, além de restauração da função da bexiga, ureteres, entre outros

5 órgãos.

RESUMO

SUBSTITUTO OU CURATIVO TISSULAR

O objetivo da presente invenção é fornecer um substituto ou curativo
tissular, onde matrizes, suportes ou moldes são formadas por nanofibras ou
5 microfibras utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis incorporado à
biomassa da *Spirulina*, visando resolver os problemas encontrados no estado
da técnica.