



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0916557-6 A2



(22) Data do Depósito: 30/07/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) Título: ARCABOUÇOS DE TECIDO DERIVADO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO PRÉ-ESTÔMAGO

(51) Int. Cl.: A61K 35/38; A61F 2/02; C12N 5/07; A01N 1/02; A61L 27/40.

(30) Prioridade Unionista: 24/04/2009 US 61/172,671; 30/07/2008 US 61/137,367.

(71) Depositante(es): MESYNTHES LIMITED.

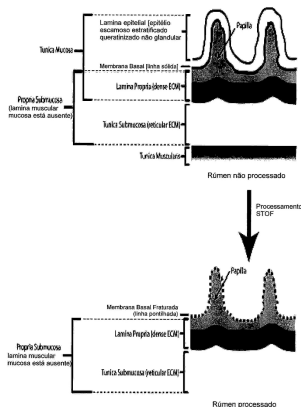
(72) Inventor(es): KERYN DALLAS JOHNSON; BARNABY CHARLES HOUGH MAY; BRIAN RODERICK WARD.

(86) Pedido PCT: PCT NZ2009000152 de 30/07/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/014021 de 04/02/2010

(85) Data da Fase Nacional: 31/01/2011

(57) Resumo: ARCABOUÇOS DE TECIDO DERIVADO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO PRÉ-ESTÔMAGO. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de arcabouços de Matriz Extracelular (ECM) derivadas do pré-estômago de um ruminante. Tais arcabouços são úteis em várias aplicações clínicas e terapêuticas, incluindo o reparo de lesões, regeneração do tecido e reconstrução da mama. Adicionalmente, a presente invenção apresenta métodos para o isolamento dos arcabouços de ECM de órgãos de mamíferos, incluindo, mas não limitados ao pré-estômago de ruminantes. Tais métodos incluem a geração de um fluxo osmótico transmural entre os dois lados do tecido. A invenção apresenta adicionalmente arcabouços de ECM laminados que contêm um polímero posicionado entre folhas individuais de arcabouços de ECM. O polímero pode conter adicionalmente moléculas bioativas para aperfeiçoar a funcionalidade do arcabouço.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ARCABOUÇOS DE TECIDO DERIVADO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO PRÉ-ESTÔMAGO".

Pedidos Relacionados

5           Esse pedido reivindica prioridade para o Pedido Provisório U.S. Nº 61/137.367, depositado em 30 de Julho de 2008 e para o Pedido Provisório U.S. Nº 61/172.671, depositado em 2 de Abril de 2009 Os conteúdos completos dos pedidos anteriores estão incorporados aqui por referência.

10 Antecedentes da Invenção

          A matriz extracelular (ECM) tem um papel importante no fornecimento do ambiente químico e estrutural ótimos para o crescimento e regeneração do tecido. Os arcabouços de ECM usados para regeneração tecidual são preparados, tradicionalmente, a partir da derme decelularizada humana e de animal isolada de vários órgãos e a partir de uma variedade de fontes de membrana submucosa e basal de animal. Esses arcabouços promovem a regeneração tecidual e são bem tolerados imunologicamente. As composições comuns para enxerto de tecido submucoso são derivadas do intestino delgado, da bexiga urinária e do estômago glandular simples (veja, 15 por exemplo, U.S. 4.902.508, U.S. 5.554.389 e U.S. 6.099.567, cujos conteúdos estão incorporados aqui por referência).

          Apesar dos avanços na produção e uso de arcabouços de ECM, a composição ideal de arcabouço ainda não foi identificada. O arcabouço ideal não é alergênico, não é carcinogênico, é mecanicamente estável sob estresse contínuo, é adequadamente poroso para permitir a capilarização, capaz de estimular e direcionar o crescimento celular e vascular apropriado, de compatibilidade similar àquela do tecido do hospedeiro, resistente à infecção, não trombogênico, acessível e capaz de se tornar um análogo totalmente funcional do tecido original. Um arcabouço de ECM que possua essas propriedades poderá ser útil em uma variedade de aplicações clínicas, incluindo o reparo de lesões e regeneração de tecido mole. 25 30

### Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a arcabouços de matriz extracelular derivados do pré-estômago de um ruminante, também referido aqui como arcabouços de "Matriz de Pré-estômago" (FM). Os arcabouços FM da invenção fornecem inúmeras vantagens sobre os arcabouços de tecido anteriores e são úteis em uma variedade de aplicações clínicas e terapêuticas, incluindo o reparo de lesões e regeneração tecidual. Adicionalmente, a presente invenção fornece métodos aperfeiçoados de produção de arcabouços de FM de órgãos de mamíferos, incluindo, mas não limitados ao pré-estômago de ruminantes. Em modalidades particulares, os arcabouços de FM da invenção podem ser derivados de um ruminante que pertença ao gênero *Capra*, *Bos*, *Cervus* ou *Ovis*, por exemplo, *Capra aegagrus hircus*, *Bos taurus*, ou *Ovis Áries*.

Conseqüentemente, em um primeiro aspecto, a invenção apresenta um arcabouço de tecido (um arcabouço de FM) que compreende a ECM da submucosa própria do rúmen de um ruminante. Em uma modalidade particular, a submucosa própria é de rúmen, o retículo, ou o omaso do rúmen. Esses arcabouços de tecido possuem, tipicamente, uma superfície luminal contornada. Os arcabouços de tecido de ECM da invenção podem conter, adicionalmente, tecido decelularizado, incluindo porções do epitélio, membrana basal ou túnica muscular e combinações das mesmas. Os arcabouços de tecido também podem compreender uma ou mais proteínas fibrilares, incluindo, mas não limitadas a colágeno I, colágeno III ou elastina e combinações das mesmas. Em outras modalidades, os arcabouços de tecido podem compreender um ou mais fatores de crescimento, incluindo, mas não limitados a FGF-2, TGFb1, TGFb2 ou VEGF e combinações das mesmas. Em outras modalidades ainda, os arcabouços de tecido podem compreender um ou mais glicosaminoglicanos, incluindo, mas não limitados a ácido hialurônico e sulfato de heparan e combinações das mesmas. Em outra modalidade, os arcabouços de tecido podem compreender uma ou mais proteínas adesivas, incluindo mas não limitadas a fibronectina, colágeno IV ou laminina e combinações das mesmas.

Arcabouços de FM da presente invenção podem ser formatados em uma variedade de maneiras, tais como uma folha simples ou como uma folha laminada que contém múltiplas folhas de FM. Em certas modalidades, os arcabouços de FM podem compreender duas a 15 folhas laminadas. Tais

5 folhas laminadas podem ser mantidas juntas por pontos ou suturas. Alternativamente, as folhas laminadas podem ser mantidas juntas por um polímero posicionado entre uma ou mais folhas. Em uma modalidade, as folhas laminadas são acopladas por pontos ou suturas e contêm adicionalmente um polímero posicionado entre uma ou mais folhas. Em uma modalidade, o ar-

10 cabouço de tecido laminado compreende um polímero posicionado entre cada uma das folhas laminadas. O polímero pode ser intercalado entre as folhas ou pode ser uniformemente distribuído como uma camada polimérica. Qualquer polímero adequado pode ser usado nos arcabouços de FM da invenção, incluindo, mas não limitado a colágeno, quitosana, alginato, álcool

15 polivinílico, carboximetil celulose, hidroxipropil celulose, e combinações das mesmas.

Em uma modalidade particular, o polímero compreende adicionalmente uma molécula bioativa, por exemplo, uma molécula pequena ou um peptídeo. A molécula bioativa pode estar não covalentemente incorporada no polímero, por exemplo, como uma suspensão, encapsulada como partículas, micropartículas ou coloides ou como uma mistura das mesmas. A molécula bioativa também pode estar covalentemente incorporada no polímero, usando qualquer química adequada para o acoplamento da molécula bioativa no polímero. A molécula bioativa pode ser qualquer molécula tera-

20 peuticamente desejável, tal como um fator do crescimento, um antimicrobiano, um analgésico, um hemostático, um agente pró-angiogênico ou um agente antiangiogênico. Em modalidades exemplificadoras, o polímero compreende um ou mais de FGF2, NGF, doxiciclina, amoxicilina e poli-L-lisina.

Em outra modalidade particular, os arcabouços de FM têm uma

30 largura de pelo menos 10 cm. Por exemplo, o arcabouço pode ter uma largura de pelo menos 10 cm e um comprimento de pelo menos 10 cm. Consequentemente, certos arcabouços de FM podem ter uma área superficial de

mais do que 100 cm<sup>2</sup>, por exemplo, 400 cm<sup>2</sup>. Em outra modalidade, o FM é fluidizado ou micronizado.

Arcabouços de FM da invenção geralmente possuem uma tensão biaxial maior do que os arcabouços obtidos de outras fontes gastrointestinais ou urogenitais. Conseqüentemente, em uma modalidade particular, os arcabouços de FM possuem uma tensão biaxial média de pelo menos 80 N ou mais.

Os arcabouços de tecido da invenção podem ser usados em múltiplas aplicações incluindo, mas não limitadas a cobrir uma falta de tecido e reforçar um tecido mole. Em uma modalidade particular, a falta de tecido ou o tecido mole têm uma largura de pelo menos 10 cm. Em outra modalidade, a falta de tecido ou o tecido mole têm uma largura de pelo menos 10 cm e um comprimento de pelo menos 10 cm. Em outra modalidade, a falta de tecido ou o tecido mole têm uma área superficial de pelo menos 100 cm<sup>2</sup>.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção apresenta um método para induzir o reparo de um tecido danificado, compreendendo contatar o tecido danificado com um arcabouço de FM da invenção, por exemplo, um que compreenda a ECM da submucosa própria de um ruminante. A invenção apresenta adicionalmente um método para estimular a regeneração de um tecido mole, compreendendo contatar o tecido mole com um arcabouço de FM da invenção.

Quando um arcabouço de FM é colocado em contato com um tecido, o arcabouço de FM pode aumentar a proliferação de células localizadas próximo do arcabouço. Adicionalmente, o arcabouço de FM pode promover a vascularização dentro do tecido ao qual ele se adere. Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção fornece um método para estimular a proliferação de células em um tecido, compreendendo contatar o tecido com um arcabouço de FM, tal que a proliferação celular seja estimulada. A invenção fornece adicionalmente um método para induzir a vascularização de um tecido, compreendendo contatar o tecido com um arcabouço de FM, tal que a vascularização ocorra dentro do tecido.

Em um aspecto, a invenção apresenta um dispositivo implantável

de arcabouço de tecido para apoiar o tecido da mama dentro de um paciente, em que o dispositivo compreende a matriz extracelular da submucosa própria do rúmen de um ruminante. O tecido da mama pode compreender uma prótese mamária, isto é, um implante mamário. O dispositivo de arcabouço de tecido pode ser formatado como uma folha laminada que compreende duas ou mais camadas de matriz extracelular. Em uma modalidade particular, a folha laminada compreende 2 a 15 camadas de matriz extracelular.

O dispositivo de arcabouço de tecido pode ser plano ou ele pode ter uma concavidade. Em uma modalidade, as camadas da matriz extracelular do dispositivo podem ser mantidas unidas por pontos ou suturas. A matriz extracelular pode ser perfurada ou ela pode não ser perfurada. Em algumas modalidades, o dispositivo tem a forma de um crescente. Em outras modalidades, o dispositivo tem uma forma elíptica.

Em outro aspecto, a invenção fornece um método de sustentar o tecido da mama dentro de um paciente, que compreende posicionar o dispositivo de arcabouço de tecido anterior dentro do paciente em uma posição de suporte em relação ao tecido da mama. Em uma modalidade, o tecido da mama compreende uma prótese mamária. Em outra modalidade, o tecido da mama compreende tecido nativo. Em uma modalidade particular, o posicionamento do arcabouço de tecido compreende revestir as seções inferior e laterais do tecido da mama.

Em outro aspecto, a invenção fornece um arcabouço de tecido que compreende duas ou mais folhas de matriz extracelular, laminadas por um polímero posicionado entre as folhas. O arcabouço pode compreender a matriz extracelular da submucosa de um tecido selecionado do grupo que consiste em intestino delgado, estômago, bexiga, pericárdio e derme. Em uma modalidade particular, a matriz extracelular compreende colágeno. O polímero pode compreender colágeno, quitosana, alginato, álcool polivinílico, carboximetil celulose, hidroxipropil celulose, e combinações das mesmas.

Em uma modalidade particular do aspecto anterior, o polímero compreende também uma molécula bioativa. A molécula bioativa pode estar não covalentemente ou covalentemente ligada ao polímero. Em uma moda-

lidade, a molécula bioativa pode ser uma molécula pequena ou um polipeptídeo, por exemplo, um fator do crescimento, um antimicrobiano, um analgésico, um hemostático, um agente pró-angiogênico, um agente antiangiogênico ou combinações das mesmas. Moléculas bioativas exemplificadoras incluem FGF2, NGF, doxíciclina, amoxicilina, poli-L-lisina e combinações das mesmas.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos para a geração de arcabouços de tecido de ECM pela separação e/ou decelularização das camadas dentro de todo ou de uma porção de um tecido. O método envolve criar um fluxo osmótico transmural entre os dois lados do tecido, tal que as camadas dentro de todo ou de uma porção do tecido são separadas e/ou decelularizadas. O fluxo osmótico transmural pode ser direcionado do lado luminal para o abluminal de todo ou de uma porção do tecido ou do lado abluminal para o luminal de todo ou de uma porção do tecido. Isso pode ser obtido, por exemplo, pela separação do tecido entre uma solução hipertônica e uma hipotônica, tal que o fluxo osmótico transmural seja direcionado da solução hipotônica para a solução hipertônica. O método pode envolver adicionalmente a remoção de todo ou de parte de uma camada do tecido incluindo o epitélio, membrana basal ou túnica muscular e combinações das mesmas.

Em uma modalidade particular, o método da invenção envolve encapsular uma primeira solução dentro de um órgão ou tecido (ou uma porção desses) e imergir o órgão ou tecido (ou uma porção desses) em uma solução que é hipertônica em relação à primeira solução. Esse método pode envolver adicionalmente a remoção do órgão ou tecido da segunda solução e a imersão do órgão ou tecido ou de uma porção desses, em uma terceira solução que também é hipertônica em relação à primeira solução a fim de, por exemplo, adicionalmente decelularizar o tecido.

Em uma modalidade alternativa, o método compreende encapsular uma primeira solução dentro de um órgão ou tecido (ou uma porção dos mesmos) e imergir o órgão ou tecido (ou uma porção dos mesmos) em uma solução que é hipotônica em relação à primeira solução, opcionalmente

seguido pela imersão do órgão ou tecido ou de uma porção dos mesmos, em uma terceira solução que também é hipotônica em relação à primeira solução.

As soluções hipertônica e hipotônica podem incluir, por exemplo, água e opcionalmente pelo menos um tampão, detergente ou sal. A solução hipertônica contém uma concentração de soluto maior do que a solução hipotônica. Em uma modalidade particular, a solução hipertônica compreende NaCl 4 M e a solução hipotônica compreende Triton X-200 0,028% e EDTA 0,1%. Em outra modalidade particular, a solução hipotônica compreende SDS 0,1%. Em outra modalidade ainda, a solução hipotônica compreende Triton X-200 0,028%, EDTA 0,1% e SDS 0,1%.

Os métodos da invenção podem ser realizados em baixas temperaturas de, por exemplo, 4°C ou menos (por exemplo, entre cerca de 2°C e cerca de 4°C). Os métodos da invenção podem, alternativamente, ser realizados em temperatura ambiente ou próximo dela (por exemplo, entre cerca de 18°C e cerca de 24°C). Os métodos também permitem que as camadas de tecido sejam separadas e decelularizadas em um período de tempo mais curto do que é possível usando outros métodos. Em modalidades particulares, as camadas de tecido são separadas e decelularizadas em 36 horas ou menos, mais preferivelmente em 24 horas ou menos. Em outras modalidades, as camadas de tecido são separadas e decelularizadas em 6 horas ou menos (por exemplo, em 5 horas ou menos, 4 horas ou menos ou 3 horas ou menos).

Os métodos da invenção podem ser empregados com qualquer fonte de tecido ou órgão adequados. Em uma modalidade particular, o tecido compreende um epitélio escamoso estratificado queratinizado. Em outras modalidades particulares, o tecido é derivado do rúmen de um ruminante, por exemplo, um animal que pertence aos gêneros *Capra*, *Bos*, *Cervus* e *Ovis*. Em outras modalidades ainda, o tecido é derivado do rúmen, do retículo ou do omaso do pré-estômago. Tais tecidos podem ser opcionalmente distendidos para aumentar o fluxo osmótico transmural através das camadas do tecido, facilitando adicionalmente a separação e a decelularização.

### Breve Descrição dos Desenhos

**Figura 1** é uma seção transversal de (A) parede do pré-estômago e (B) parede do estômago glandular, ambas e um estado não processado e depois do processamento STOF.

5 **Figura 2** ilustra dois formatos exemplificadores de arcabouços de FM úteis no aumento, reconstrução da mama ou mastopexia. (A) ilustra um arcabouço em formato de crescente. (B) ilustra um arcabouço em forma elíptica.

**Figura 3** ilustra uma modalidade de um método de processamento de um órgão pelo estabelecimento de um fluxo osmótico transmural através do órgão.

**Figura 4** ilustra uma modalidade exemplificadora do processamento de um tecido usando STOF para produzir um arcabouço de FM decelularizado com a membrana basal fraturada.

15 **Figura 5** mostra o conteúdo total de ácido nucleico do tecido antes e depois do processo STOF.

**Figura 6** mostra o relacionamento linear entre a área da superfície do tecido do pré-estômago e aumentos no volume total do pré-estômago depois do processo STOF.

20 **Figura 7** mostra a alteração no peso do tecido como resultado de fluxo osmótico transmural. O fluido que passa através e por dentro do tecido resultou em ganho de peso já que a hidratação do tecido aumentou.

**Figura 8** mostra a detecção por Western blot de laminina em soluções STOF no término do processo STOF.

25 **Figura 9** apresenta os resultados do teste Ball Burst, mostrando a tensão relativa de FM.

**Figura 10** ilustra graficamente a tensão ball burst de produtos de FM multicamadas de ovino. A tensão biaxial de produtos de FM com uma ou múltiplas camadas de ovino foi determinada usando o Test Ball Burst de acordo com ASTM D 3797-89 "Standard Test Method for Bursting Strength of Knitted Goods, Constant-Rate-of-Transverse (CRT) Ball-burst Test", usando um analisador eletromecânico Instron série 5800, equipado com uma gaiola

de compressão ball-burst, através do que uma bola de aço inoxidável é empurrada contra o material de teste em uma taxa de alimentação de 305 +/- 13 mm/min, até romper. Uma célula de carga de 1 kN foi usada para registrar a carga de compressão máxima na ruptura (N). As barras de erro representam o erro padrão de pelo menos cinco amostras.

**Figura 11** ilustra uma comparação da carga de compressão máxima normalizada de produtos para implante de FM com 4 camadas de ovino e comercialmente disponíveis. As barras de erro representam o erro padrão de pelo menos cinco amostras ou dos dados publicados.

**Figura 12** apresenta os resultados do teste Uniaxial, mostrando a tensão relativa de FM.

**Figura 13** apresenta uma comparação da tensão de produtos de FM com uma e múltiplas camadas de ovino. (A) Carga máxima na ruptura (N); (B) Rigidez tangencial máxima (N/mm); (C) Alongamento máximo (mm); (D) Módulo de elasticidade (de Young) (GPa); (E) Tensão de escoamento (MPa); e (F) espessura. A carga máxima até a ruptura de produtos com uma e múltiplas camadas foi determinada usando um analisador eletromecânico Instron série 5800. Vários materiais foram cortados como amostras na forma de osso de cachorro com uma largura de 0,6 cm. As amostras foram pinçadas com uma distancia de 7,5 cm e alongadas em uma taxa de 25,4 mm/min até romperem. A carga (N) foi registrada usando uma célula de carga de 500 N. A rigidez foi calculada a partir da inclinação da curva de carga (N) versus alongamento (mm). A curva de carga versus alongamento foi transformada em uma curva de tensão ( $N/m^2$ ) versus deformação, usando uma área da seção transversal calculada a partir da espessura do produto. A inclinação dessa última curva foi usada para calcular o módulo de elasticidade ou módulo de Young (GPa). As barras de erro representam o erro padrão de pelo menos cinco amostras.

**Figura 14** apresenta uma comparação da tensão de cedência de produtos de FM de ovino com 1 e duas camadas com produtos duros para reparação comerciais. As barras de erro representam o erro padrão de pelo menos cinco amostras ou dos dados publicados.

**Figura 15** representa uma comparação da tensão de retenção da sutura de produtos de FM de ovino com múltiplas camadas. Amostras de produtos de FM de ovino com múltiplas camadas foram testados quanto à retenção da sutura de acordo com as ANSI/AAMI VP20-1994 Guidelines for Cardiovascular Implants Vascular Prostheses Measured in Newton's. As suturas foram feitas em amostras de 4 cm x 2,5 cm, usando uma sutura com uma profundidade de 2 mm. A carga na ruptura foi registrada usando um analisador eletromecânico Instron série 5800, equipado com uma célula de carga de 100 N usando uma taxa de avanço de 100 mm/min. A carga na ruptura foi definida como uma redução de 90% na carga observada. A extremidade livre da amostra foi segura com um alicate de pressão de 25 mm enquanto que a sutura foi acoplada a braçadeira oposta através de um gancho de aço inoxidável. As barras de erro representam o erro padrão de pelo menos seis amostras.

**Figura 16** apresenta uma comparação da tensão de retenção normalizada da sutura de produtos de FM de ovino e produtos durais para reparação. Os erros representam os erros padronizados de cinco amostras independentes ou dos dados publicados.

**Figura 17** representa uma comparação da tensão de retenção normalizada da sutura de produtos de FM de ovino com 4 camadas e matrizes para implante comercialmente disponíveis. Os erros representam os erros padronizados de pelo menos cinco amostras ou dos dados publicados. Nenhum erro relatado para Surgisis<sup>®</sup>, Alloderm<sup>®</sup> e Strattice<sup>®</sup> testados com uma profundidade de 10 mm, FM de ovino com 4 camadas e Surgisis<sup>®</sup> testados com uma profundidade de 2 mm.

**Figura 18** apresenta um exemplo do esboço de lesões excisionais de espessura total feitas no dorso de um porco durante o decorrer de um estudo de cicatrização de lesão em porcinos.

**Figura 19** apresenta a persistência de arcabouços de ECM em tecidos de biópsia retirados durante o decorrer de um estudo de cicatrização de lesão.

**Figura 20** ilustra graficamente a quantificação da proliferação

celular durante a cicatrização de uma lesão. O tecido lesionado foi tratado com FM de ovino (1 camada, duas camadas), SIS ou não foi tratado e o número total de células positivas para Ki67 em três quadros de 40 x feitos a partir da camada epitelial e três quadros de 40 x feitos a partir da camada dérmica em regeneração foi contado usando IHC e métodos digitais. \*\*P<0,01 significância em relação ao controle não tratado usando one-way ANOVA.

**Figura 21** ilustra graficamente a quantificação de vasos sanguíneos no tecido lesionado tratado com FM de ovino (1 camada e duas camadas), SIS ou tecido lesionado que não foi tratado. (A) ilustra o número médio total de vasos sanguíneos contados por quadro, analisados para cada biópsia de tecido. As barras de erro representam os erros padronizados das 20 biópsias analisadas para cada grupo de tratamento nos pontos de tempo indicados. \*\*P<0,01 e \*P<0,05 significância em relação ao controle não tratado, usando one-way ANOVA. (B) ilustra o número de vasos sanguíneos (pequenos, médios e grandes) como uma proporção do total de vasos sanguíneos observados para cada um dos tratamentos, nos pontos de tempo indicados. (C) ilustra o número médio de vasos sanguíneos pequenos (300 a 500  $\mu\text{m}^2$ ), contados por quadro. As contagens foram calculadas como a média de todos os quadros analisados dos cinco animais sob estudo. As barras de erro representam os erros padronizados dos 20 quadros analisados para cada grupo de tratamento nos pontos de tempo indicados. (D) ilustra o número médio de vasos sanguíneos médios (500 a 1500  $\mu\text{m}^2$ ), contados por quadro. As contagens foram calculadas como a média de todos os quadros analisados dos cinco animais sob estudo. As barras de erro representam os erros padronizados dos 20 quadros analisados para cada grupo de tratamento nos pontos de tempo indicados. (E) ilustra o número médio de vasos sanguíneos grandes (> 1500  $\mu\text{m}^2$ ), contados por quadro. As contagens foram calculadas como a média de todos os quadros analisados dos cinco animais sob estudo. As barras de erro representam os erros padronizados dos 20 quadros analisados para cada grupo de tratamento nos pontos de tempo indicados.

### Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de arcabouços de Matriz Extracelular (ECM) derivados da lâmina própria e submucosa do pré-estômago de um ruminante, referidas aqui como "Matriz de Pré-estômago" (FM). Os arcabouços de FM possuem características distintas que diferem dos arcabouços de ECM derivados de outros órgãos, incluindo o estômago glandular. Essas características tornam os arcabouços de FM particularmente bem adequados para aplicações clínicas que envolvem a regeneração e o reparo do tecido. A presente invenção refere-se ainda a métodos para gerar arcabouços de ECM de órgãos de mamíferos, incluindo, mas não limitados ao pré-estômago.

#### I. Definições

De modo que a invenção possa ser mais facilmente compreendida, certas expressões são definidas primeiro.

A expressão "Matriz de Rúmen" (abreviada FM), como usada aqui, refere-se a um arcabouço de ECM que contém a lâmina própria e a submucosa do pré-estômago de um ruminante.

A expressão "própria-submucosa", como usada aqui refere-se à estrutura de tecido formada pela junção da lâmina própria e da submucosa no pré-estômago do ruminante.

A expressão "lâmina própria", como usada aqui, refere-se a porção luminal da própria-submucosa, que inclui uma camada densa de matriz extracelular.

A expressão "ruminante", como usada aqui, refere-se a um mamífero que possui um estômago com quatro câmaras. Essas incluem um pré-estômago, compreendido por um rúmen, um retículo e um omaso e uma quarta câmara conhecida como abomaso. Exemplos não limitantes de ruminantes incluem mamíferos que pertencem ao gênero *Capra*, *Bos*, *Cervus* e *Ovis*.

A expressão "derivado de", como usada aqui, refere-se a fonte ou a origem do tecido de uma ECM. ECMs podem ser derivadas no todo ou em parte de tecidos, tais como aqueles que retêm pelo menos um componente do tecido, tal como a própria-submucosa.

A expressão "própria-submucosa", como usada aqui, refere-se a uma porção da parede do pré- estômago de um ruminante que consiste da lâmina própria e a túnica submucosa.

5 A expressão "Fluxo Osmótico Transmural Selado" (STOF), como usada aqui, refere-se a um método de decelularização e/ou separação das camadas de tecido ou órgãos no qual o fluxo osmótico transmural é estabelecido através de toda ou de parte da parede do tecido ou órgão.

10 A expressão "hipertônica", como usada aqui, refere-se a uma solução que possui uma maior concentração de soluto em relação a outra solução.

A expressão "hipotônica", como usada aqui, refere-se a uma solução que possui uma menor concentração de soluto em relação a outra solução.

15 A expressão "delaminado", como usada aqui refere-se a separação de camadas dentro de um tecido ou órgão.

A expressão "decelularizado", como usada aqui, refere-se a remoção de células e seus resíduos relacionados de uma porção de um tecido ou órgão, por exemplo, da ECM.

20 A expressão "reconstrução da mama", como usada aqui, refere-se a qualquer procedimento pretendido para alterar o tamanho, a forma, posição ou aspecto de uma mama em uma paciente. Tais procedimentos incluem, mas não são limitados ao aumento da mama, mastopexia (isto é, elevação da mama) e reconstrução pós-mastectomia.

25 Vários aspectos da invenção são descritos em detalhes adicionais nas seções subsequentes. A menos que definido de outra maneira, todas as expressões técnicas e científicas usadas aqui têm o mesmo significado como comumente compreendidas por aqueles versados na técnica a qual essa invenção pertence. Em caso de conflito, o presente pedido, incluindo as definições, prevalecerá. Embora métodos e materiais similares ou  
30 equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática da invenção, exemplos de métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Os materiais, métodos e exemplos aqui descritos são apenas ilustrativos e não

pretendem ser limitantes. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui mencionadas estão incorporadas por referência em sua totalidade.

## II. Anatomia do Pré-estômago de um Ruminante

5 Ruminantes (por exemplo, gado, carneiros e cabras) possuem estômagos compostos que diferem do estômago simples de outros mamíferos pelo fato de que o estômago composto é substancialmente maior e é dividido em quatro seções: o rúmen, retículo, omaso e abomaso. Cada uma dessas seções tem uma estrutura física e histológica distintas. Coletivamente, o rúmen, retículo e omaso são conhecidos como pré-estômago (pró-ventrículo). O rúmen e o retículo são intimamente relacionados em estrutura e função e são geralmente referidos como rúmen-retículo. Apenas a última câmara do estômago composto, o abomaso, é estruturalmente análoga ao estômago glandular simples. As diferenças anatômicas entre o pré-estômago e o estômago glandular simples refletem seus papéis funcionais distintos. As funções primárias do pré-estômago são de armazenamento, fermentação e absorção, enquanto que o estômago glandular simples realiza funções secretórias e digestivas.

Consequentemente, o pré-estômago tem características anatômicas e histológicas macroscópicas que são bastante distintas daquelas do estômago glandular. As características anatômicas do pré-estômago estão ilustradas na figura 1A e aquelas do estômago glandular estão ilustradas na figura 1B. O pré-estômago, principalmente, não contém uma mucosa glandular, mas é compreendido por um epitélio escamoso estratificado queratinizado não glandular, que consiste da camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal e parece em vários aspectos análogo à estrutura da pele. O epitélio está localizado no lado luminal do pré-estômago e é separado da própria-submucosa subjacente por uma membrana basal. O lado abluminal do pré-estômago contém uma camada muscular conhecida como túnica muscular.

As composições de submucosa do estômago previamente descritas são derivadas da parede do estômago glandular, que contém as se-

guintes camadas: a túnica mucosa (incluindo a camada epitelial, a camada da lâmina própria que consiste em tecido reticular ou areolar delgado e uma camada glandular), a camada da túnica submucosa (composta de tecido areolar e sem glândulas), a camada da túnica muscular (composta de três camadas de músculo) e a serosa (uma camada de mesotélio do lado de fora do tecido conjuntivo frouxo que envolve as camadas musculares). A presença da camada glandular dentro da parede do estômago é característica do estômago glandular, gástrico ou simples de mamíferos monogástricos. Apenas a última câmara do estômago complexo dos ruminantes, o abomaso, contém essa camada glandular. As características adicionais do pré-estômago e do estômago glandular estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características do pré-estômago e do estômago glandular

Característica	Pré-estômago	Estômago glandular
Epitélio	Escamoso estratificado queratinizado	Colunar simples
Glândulas	Não	Sim
Lâmina muscular mucosa presente	Não	Sim
Lâmina própria se mistura na submucosa criando a própria-submucosa	Sim	Não
Lâmina própria	Densa	Frouxa
Lâmina própria contém Colágeno IV e Laminina	Sim	Não
Papila sobre a superfície	Sim	Não
Lâmina própria mantida com a própria-submucosa quando o epitélio é fisicamente delaminado	Sim, a lâmina própria densa resiste a delaminação física	Não, perda da lâmina própria e glândulas não resistem a laminação física
Lâmina própria densa no lado luminal da própria-submucosa	Sim	Não
Superfície contornada quando o epitélio é delaminado	Sim, devido a ECM dentro da papila	Não

Duas características únicas do pré-estômago em relação ao estômago glandular são que a lâmina própria do pré-estômago é muito mais densa e não inclui glândulas ou uma camada glandular. Adicionalmente, a lâmina muscular mucosa, uma camada muscular fina na região basal da camada da t[única mucosa do estômago glandular, está ausente no rúmen e na maior parte do retículo. Na ausência da lâmina muscular, a lâmina própria se funde com a submucosa para formar uma camada que é coletivamente referida como própria-submucosa. Também exclusiva do pré-estômago é uma banda incomumente espessa e densa de ECM dentro da lâmina própria, que corre paralela à superfície epitelial. Essa banda de tecido contém colágeno IV e laminina, que desempenham um papel crítico no crescimento, diferenciação e migração celular durante o desenvolvimento e reconstrução do tecido. Embaixo dessa banda de tecido, a ECM tem um padrão reticular aberto mais típico. Está incluído na ECM do pré-estômago o glicosaminoglicano sulfato de heparan, um importante cofator que modula a bioatividade do fator de crescimento FGF2. Como referido na patente U.S. 6.099.567, o sulfato de heparan não está presente na submucosa do estômago glandular. Essa é uma diferenciação importante entre as duas ECMs.

O tecido do pré-estômago também inclui protrusões superficiais conhecidas como papilas no rúmen, cristas reticulares no retículo e lamelas no omaso. A própria-submucosa se prolonga dentro dessas protrusões.

### III. Arcabouços de Tecido Derivados do Pré-estômago

De acordo com a presente invenção, os arcabouços de ECM podem ser derivados do rúmen, retículo ou do omaso do pré-estômago. Tais arcabouços de ECM (referidos aqui como "Matriz de Pré-estômago" ou FM) são caracterizadas pelo fato de conterem as camadas da lâmina própria e submucosa (própria-submucosa) da parede do pré-estômago. Em uma modalidade particular da invenção, os arcabouços de FM são derivados do rúmen ou de lamelas individuais dentro do omaso. Adicionalmente à própria-submucosa, os arcabouços de FM podem incluir, opcionalmente, camadas intactas ou parciais de epitélio decelularizado, membrana basal ou túnica muscular (veja figura 1A).

Como resultado da estrutura e função exclusivas do pré-estômago, os arcabouços de tecido de ECM da invenção derivados do pré-estômago possuem propriedades bioquímicas, estruturais e físicas diferentes em relação aos arcabouços previamente descritos isolados do estômago glandular, intestino e bexiga. Em particular, FM inclui uma banda densa de e ECM dentro da lâmina própria. Adicionalmente, FM inclui, opcionalmente, uma membrana basal intacta ou fraturada. Em contraste, um arcabouço derivado da submucosa do estômago glandular ou da submucosa do intestino delgado incluirá pouca, se alguma, lâmina própria, por que a lâmina própria está localizada principalmente entre as glândulas da mucosa e é, consequentemente, removida quando a mucosa é delaminada. A histologia mostra, de maneira importante, que a lâmina própria é incomumente densa, enquanto que o lado abluminal do arcabouço de FM é estruturado como uma matriz reticular aberta. Essas diferenças cumprem um papel importante na regeneração epitelial, já que o lado denso atua como uma barreira à migração celular, enquanto que o lado menos denso não apresenta uma barreira e, portanto, permite a invasão celular. Essa estrutura torna a FM bem adequada para estimular a regeneração epitelial sobre o lado luminal denso da matriz e a invasão de fibroblastos sobre o lado abluminal menos denso da matriz, quando usada como um dispositivo médico para regeneração de tecido. Ao contrário, enxertos de tecido de submucosa derivados do estômago glandular e da bexiga urinária possuem densidade uniforme.

A camada densa de ECM da lâmina própria contribui para a espessura e resistência aumentadas dos arcabouços de FM comparados com aqueles derivados de outros órgãos. Uma comparação da espessura e resistência ao rompimento das composições derivadas do pré-estômago e aquelas derivadas de outros órgãos é fornecida nos Exemplos 11 e 12. A grande área de superfície do pré-estômago e a espessura e resistência aumentadas dos arcabouços derivados do pré-estômago permitem o isolamento de arcabouços de ECM maiores do pré-estômago do que é possível de outros órgãos. Por exemplo, arcabouços de ECM da invenção podem ter uma largura tão grande quanto 5 cm (por exemplo, 0,5 cm, 1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm ou 5

cm), mais preferivelmente pelo menos 6 cm, 7 cm, 8 cm ou 9 cm e o mais preferivelmente pelo menos 10 cm ou mais. Adicionalmente, os arcabouços de ECM da invenção podem ter um comprimento tão grande quanto 5 cm (por exemplo, 0,5 cm, 1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm ou 5 cm), mais preferivelmente pelo menos 6 cm, 7 cm, 8 cm ou 9 cm e o mais preferivelmente pelo menos 10 cm ou mais. Conseqüentemente, em uma modalidade particular, os arcabouços de FM da invenção podem ter uma largura e um comprimento de 10 cm ou mais, um tamanho muito maior do que arcabouços de ECM derivados de outros órgãos. Arcabouços de FM exemplificadores podem ter uma área superficial de pelo menos 100 cm<sup>2</sup>, 200 cm<sup>2</sup>, 300 cm<sup>2</sup>, 400 cm<sup>2</sup>, 500 cm<sup>2</sup>, 600 cm<sup>2</sup>, 700 cm<sup>2</sup>, 800 cm<sup>2</sup>, 900 cm<sup>2</sup>, 1000 cm<sup>2</sup>, ou mais. Em uma modalidade particular, o arcabouço de FM tem uma área superficial de aproximadamente 400 cm<sup>2</sup>.

Diferentes dos arcabouços obtidos do estômago glandular, os arcabouços de ECM derivados do pré-estômago (isto é, os arcabouços de FM) podem incluir colágeno IV e laminina da membrana basal sobre a superfície luminal. Surpreendentemente, essas proteínas também estão presentes dentro da banda densa da lâmina própria, fornecendo substratos importantes para a adesão e crescimento da célula epitelial. Os arcabouços de estômago glandular não incluem, tipicamente, o epitélio ou a membrana basal ou suas porções, por que essas camadas são frágeis e não resistem a delaminação física (veja figura 1B). Um arcabouço de submucosa glandular pode incluir resquícios da lâmina mucosa muscular sobre o lado luminal e de túnica muscular sobre o lado abluminal.

Os arcabouços de FM possuem uma superfície luminal contornada, análoga às pregas epiteliais da derme. Ao contrário, os arcabouços delaminados de submucosa do intestino delgado, bexiga urinária e estômago glandular possuem uma superfície luminal relativamente lisa. A superfície luminal contornada de FM fornece uma topologia complexa que favorece a regeneração epitelial. Essa topologia não está presente nos arcabouços de ECM derivados da submucosa do intestino delgado, submucosa do estômago glandular ou da submucosa da bexiga urinária.

Os arcabouços de FM da invenção contêm fatores reguladores importantes para o reparo de lesões, incluindo, mas não limitados aos fatores de crescimento FGF-2, TGFb1, TGFb2 e VEGF e os glicosaminoglicanos ácido hialurônico e sulfato de heparan. FGF2 desempenha um papel importante na cicatrização de lesões pela sinalização para a migração e diferenciação celular necessária para a formação do novo tecido e da vascularização. O sulfato de heparan é um cofator importante que modula a bioatividade de FGF2 pela atuação sobre os receptores de FGF2. O sulfato de heparan é necessário para a atividade de FGF2 a aumenta a estabilidade de FGF2. Importante ressaltar que FGF2 e sulfato de heparan não estão presentes na submucosa do estômago. FM contém adicionalmente, proteínas fibrilares que incluem o colágeno I, colágeno III e elastina, assim como proteínas adesivas que incluem a fibronectina, colágeno IV e laminina. Essas proteínas, em particular o colágeno e a elastina, contribuem para a alta resistência a tração e elasticidade dos arcabouços de FM. Uma quantificação detalhada da composição molecular do arcabouço de FM é fornecida no Exemplo 7.

Em modalidades particulares, os arcabouços de FM podem ser laminados juntos para formar folhas com múltiplas camadas. Por exemplo, FM laminado pode compreender 2 ou mais folhas de arcabouço de FM (por exemplo, entre 2 e 20 folhas de arcabouço de FM, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais folhas). Em uma modalidade particular, o FM laminado compreende entre 2 e 15 folhas de arcabouço de FM, por exemplo, 2 a 10 folhas, 2 a 8 folhas, 2 a 6 folhas ou 2 a 4 folhas de arcabouço de FM. As folhas de arcabouço de FM podem ser laminadas juntas usando qualquer técnica adequada conhecida. Adicionalmente, a laminação pode ser obtida usando um polímero, como descrito abaixo. A laminação pode ser obtida com ou sem sutura com uma material de sutura reabsorvível ou não reabsorvível ou equivalente adequado.

A resistência e as características físicas do arcabouço de FM se traduzem nas características de manuseio aperfeiçoadas em relação a arcabouços derivados de fontes de EM mais finas e mais fracas. Como os arca-

bouços de FM são fisicamente mais robustos do que os arcabouços de ECM isolada de outras fontes, por exemplo, do estômago glandular, eles fornecem maior facilidade de manuseio e são mais resistentes a deformações pelo manuseio. Isso tem implicações importantes na prática clínica, onde o manuseio do arcabouço é necessário antes e durante os procedimentos cirúrgicos.

Os arcabouços de FM podem não ser perfurados ou eles podem ser perfurados. As perfurações podem ser introduzidas no arcabouço de FM usando qualquer método adequado, incluindo a perfuração manual ou a perfuração a laser. O tamanho do poro pode variar entre cerca de 10 a cerca de 500 micra (por exemplo, cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 ou cerca de 500 micra). As perfurações podem ser introduzidas a qualquer momento durante a produção dos arcabouços de FM, mas é feita preferivelmente antes da esterilização. As perfurações podem passar, completamente, através do arcabouço de FM. Em um arcabouço de FM laminado que compreende múltiplas camadas de folhas de FM, as perfurações trespassam completamente todas as camadas do arcabouço ou podem trespassar apenas algumas camadas e, conseqüentemente, penetrarem apenas parcialmente através do arcabouço. A perfuração permite que as células se infiltrem mais facilmente no arcabouço, permitindo o crescimento mais rápido do tecido e a remodelagem do arcabouço.

Os arcabouços de FM da invenção são pelo fato de que eles combinam características de manuseio aperfeiçoadas, estão disponíveis em formatos maiores e incluem novas combinações de constituintes bioquímicos.

Embora os métodos adequados de isolamento de arcabouços de ECM do pré-estômago de um ruminante estejam aqui descritos, a invenção pretende abranger arcabouços de ECM que são isolados do pré-estômago de um ruminante por qualquer meio, incluindo, mas não limitado ao método STOF descrito abaixo.

#### 30 IV. Arcabouços de Tecido Laminado

Os arcabouços de ECM podem ser unidos juntos para formar uma folha laminada com múltiplas camadas. A laminação de arcabouços de

ECM aumenta a resistência do arcabouço, tornando as composições de ECM laminada particularmente adequadas para aplicações onde o arcabouço é necessário para suportar carga e/ou reter suturas ou grampos. As folhas podem ser unidas em várias orientações. Por exemplo, duas ou mais

5 folhas podem ser empilhadas na mesma orientação com relação uma a outra, isto é, tal que a superfície luminal da matriz de uma folha contate a superfície abluminal da matriz da folha adjacente. Em uma modalidade alternativa, duas ou mais folhas podem ser empilhadas na direção oposta em relação com a outra, isto é, tal que a superfície luminal da matriz de uma folha

10 contate a superfície luminal da matriz da folha adjacente ou tal que a superfície abluminal da matriz de uma folha contate a superfície abluminal da matriz da folha adjacente. Arcabouços de FM laminados podem ser formados pela ligação de duas ou mais camadas de arcabouço de FM usando várias técnicas incluindo, mas não limitadas a uma camada polimérica adesiva,

15 sutura ou simplesmente desidratando as camadas de FM que se contactam.

#### A. Arcabouços de Tecido Laminado Contendo Polímeros Adesivos

Os métodos convencionais de laminação de arcabouços de ECM para formar folhas com múltiplas camadas envolvem o uso de agentes químicos para reticular os arcabouços de ECM diretamente um com o outro.

20 Atuando diretamente sobre o arcabouço de ECM, tais agentes modificam o arcabouço e conseqüentemente, alteram as propriedades biológicas do arcabouço. A presente invenção supera essa limitação pelo fornecimento de métodos de formação de arcabouços de ECM laminados (por exemplo, arcabouços de FM) sem a modificação química do próprio arcabouço. Um de

25 tais métodos envolve a distribuição de um polímero entre uma ou mais camadas do arcabouço de ECM. O polímero serve como um adesivo, unindo camadas alternadas de arcabouço de ECM em uma composição de múltiplas camadas. O polímero também pode ser aplicado sobre as superfícies externas de um arcabouço de ECM. É importante observar que o uso de um

30 polímero para ligar uma pilha de arcabouços de ECM invalida a necessidade de reticulação química ou outras modificações covalentes da ECM para gerar uma composição laminada. Portanto, as propriedades biológicas do ar-

cabouço de ECM original são mantidas nos arcabouços laminados.

Os métodos que usam polímeros para gerar composições de ECM como aqui descritas são aplicáveis na laminação de múltiplas camadas de arcabouço de ECM ou múltiplas camadas de outros arcabouços de ECM conhecidos na técnica, por exemplo, composições de ECM derivadas do estômago glandular simples, submucosa do intestino delgado, submucosa da bexiga ou ECM da derme. Em certas modalidades, um polímero pode ser usado para formar folhas laminadas de Alloderm<sup>®</sup>, Strattice<sup>®</sup> ou Surgisis<sup>®</sup> ou combinações das mesmas. Os polímeros também podem ser usados para formar uma composição laminada nas quais camadas de FM são laminadas com outros arcabouços de ECM, por exemplo, arcabouços derivados do estômago glandular, submucosa do intestino delgado, submucosa da bexiga, pericárdio ou ECM da derme, por exemplo, Alloderm<sup>®</sup>, Strattice<sup>®</sup> ou Surgisis<sup>®</sup>.

Em uma modalidade, folhas laminadas de ECM (por exemplo, folhas de FM) são formadas pela distribuição de um polímero entre duas ou mais camadas alternadas de arcabouço de ECM (por exemplo, arcabouço de FM). O polímero pode ser distribuído intermitentemente através do arcabouço de ECM ou ele pode estar presente como uma camada contínua. Uma camada de polímero pode ser aplicada como filmes ou folhas intactas ou como soluções ou géis. O polímero tem o efeito de ligar duas folhas sucessivas de ECM. Em uma modalidade preferida, o polímero forma uma camada contínua e intacta dentro do sanduíche de laminado. O polímero pode ser aplicado, adicionalmente ou alternativamente, na superfície externa de um arcabouço de ECM laminado. Uma gama de polímeros adequados incluindo o colágeno, quitosana, alginato, álcool polivinílico, carboximetil celulose ou hidroxipropil celulose ou combinações das mesmas pode ser usada para laminar folhas sucessivas de arcabouço de ECM. Os polímeros podem ser aplicados como filmes, folhas, soluções, suspensões ou géis a folhas de ECM liofilizadas, depois desidratadas para fornecer folhas de ECM laminada. Alternativamente, os polímeros podem ser aplicados como soluções, suspensões, géis ou filmes secos s folhas de ECM úmidas, depois desidra-

tadas para fornecer a ECM laminada. Outros polímeros adequados incluem, mas não são limitados a polímeros de ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polilático coglicólico (PLLA) e ácido (polilático)-ácido (poliglicólico) (PLGA), descritos em qualquer um dos Pedidos de Patente N<sup>os</sup> 5 2002/0119180 ou 2003/0031696 ou nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 6.281.256, 6.472.210, 5.885.829, 5.366.734; 5.366.733; 5.366.508; 5.360.610; 5.350.580; 5.324.520; 5.324.519; 5.324.307; 5.320.624; 5.308.623; 5.288.496; 5.281.419; 5.278.202; 5.278.201; 5.271.961; 5.268.178; 5.250.584; 5.227.157; 5.192.741; 5.185.152; 5.171.217; 5.143.730; 10 5.133.755; 5.108.755; 5.084.051; 5.080.665; 5.077.049; 5.051.272; 5.011.692; 5.007.939; 5.004.602; 4.961.707; 4.938.763; 4.916.193; 4.898.734; 4.898.186; 4.889.119; 4.844.854; 4.839.130; 4.818.542; 4.744.365; 4.741.337; 4.623.588; 4.578.384; 4.568.559; 4.563.489; 4.539.981; 4.530.449; 4.384.975; 4.300.565; 4.279.249; 4.243.775; 15 4.181.983; 4.166.800; 4.137.921, cujos conteúdos estão incorporados aqui por referência em sua totalidade.

Como será observado pelo técnico experiente, a camada polimérica contribui para as características de desempenho global do arcabouço laminado.

20 Conseqüentemente, as diferentes características de resistência e manuseio do laminado podem ser produzidas pela alteração da camada polimérica. Adicionalmente, alterações nas composições da camada de polímero podem ser usadas para alterar a taxa de hidratação do laminado e sua estabilidade proteolítica. Por exemplo, o uso de um polímero relativamente 25 hidrofóbico resulta em uma taxa de hidratação diminuída do laminado em relação a um laminado criado usando um polímero hidrofílico. Polímeros não naturais e sintéticos (por exemplo, álcool polivinílico) podem ser esperados possuir uma taxa de estabilidade enzimática aumentada em relação a polímeros que ocorrem naturalmente (por exemplo, polissacarídeos).

30 Pela distribuição de um polímero entre camadas sucessivas de um arcabouço de ECM laminado, podem ser geradas composições que compreendem 2 ou mais folhas de arcabouço de ECM (por exemplo, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais folhas de arcabouço de ECM). Em uma modalidade exemplificadora, o arcabouço de ECM é um arcabouço de FM.

Em uma modalidade, um gel de colágeno preparado a partir de FM pode ser usado como o polímero para laminar duas ou mais camadas de arcabouço de FM. Esse gel retém as qualidades bioquímicas do arcabouço de FM parental e sofre remodelagem quando usado, por exemplo, como parte de um arcabouço de FM laminado para regeneração de tecido.

#### B. Arcabouços de Tecido Laminado Formados Usando Pontos ou Suturas

As folhas de ECM laminadas (por exemplo, folhas de FM laminadas) podem ser formadas, alternativamente, pela costura de múltiplas camadas de ECM. As propriedades físicas de FM (tamanho, espessura, resistência, etc.) permitem que as folhas sejam costuradas ou suturadas juntas para formar laminados para uso subsequente. Os laminados podem ser costurados com ou sem uma camada de polímero situada entre as folhas de FM individuais.

A costura fornece outros meios de alterar as características de desempenho dos arcabouços laminados. A costura também pode auxiliar na criação de dispositivos com um ou mais pedaços de folhas de FM laminadas ou isoladas, que possuem uma arquitetura tridimensional que é útil para um local anatômico específico. A costura ajuda a manter a forma tridimensional do laminado depois da reidratação e durante o manuseio.

As folhas de arcabouço de FM podem ser costuradas usando qualquer fio adequado, incluindo, mas não limitados a uma sutura absorvível (por exemplo, poliglecaprona 25 (Monocryl), polidioxanona (PDS), poliglactina-910 (Vicryl), ácido poliglicólico (Dexon)), sutura não absorvível (por exemplo, nylon (Ethilon), polipropileno (Prolene), fio de algodão ou fio de seda. O fio pode ter várias espessuras ou calibres dependendo das características de resistência requeridas (por exemplo, sutura 6-0, 5-0 ou 4-0) e pode ser costurado usando uma variedade de tamanhos de ponto (por exemplo, 2 mm, 4 mm ou 6 mm) e padrões (por exemplo, ponto reto, ponto corrido, ponto em zig-zag, ponto em overlock ou ponto fechado).

### C. Arcabouços de Tecido Laminado Contendo Moléculas Bioativas

Como descrito acima, a invenção refere-se em parte a arcabouços de ECM laminados (por exemplo, arcabouços de FM) que incluem um polímero situado entre as folhas individuais de ECM. Esse polímero auxilia na ligação de folhas adjacentes do arcabouço de ECM. A composição do polímero pode ser modificada a fim de alterar as propriedades do arcabouço de ECM laminado, incluindo o efeito que o arcabouço transmite sobre um tecido ou órgão. Em uma modalidade particular, o polímero pode ser usado como um veículo para a liberação de moléculas bioativas para um tecido ou órgão, permitindo que as moléculas bioativas sejam liberadas no local de contato. Os arcabouços de tecido que contêm moléculas bioativas podem ser usados, por exemplo, para promover a taxa e a qualidade da regeneração do tecido e para prevenir ou tratar uma infecção aguda ou crônica.

Qualquer molécula bioativa desejável pode ser incorporada no polímero. Moléculas adequadas incluem, por exemplo, moléculas pequenas, peptídeos ou proteínas ou suas misturas. Em algumas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) moléculas bioativas distintas podem ser incorporadas no polímero. Moléculas bioativas podem estar não covalentemente incorporadas no polímero tanto como suspensões, encapsuladas como partículas, micropartículas e/ou coloides quanto como uma mistura das mesmas. As moléculas bioativas também podem estar covalentemente incorporadas no polímero usando químicas apropriadas para ligar a molécula bioativa ao polímero. O polímero que contém uma ou mais moléculas bioativas pode estar distribuído entre uma ou mais folhas de ECM de um arcabouço de ECM laminado (por exemplo, um arcabouço de FM) e/ou pode ser aplicado sobre a superfície externa do arcabouço. Em uma modalidade particular, um polímero que contém uma primeira molécula bioativa é distribuído entre algumas camadas de um arcabouço de ECM laminado e um polímero que contém uma segunda molécula bioativa é distribuído entre outras camadas de um arcabouço de ECM laminado. Moléculas bioativas adequadas incluem, mas não são limitadas a antimicrobianos, analgésicos, fatores do crescimento, hemostáticos agentes pró e antiangiogênicos e combina-

ções das mesmas. Em modalidades particulares, as moléculas bioativas incorporadas em uma camada de polímero de um arcabouço de ECM laminado incluem FGF2, NGF, doxiciclina, poli-L-lisina e suas combinações. Em outra modalidade particular, a camada de polímero contém um agente antimicrobiano e um fator de crescimento. Importante observar que, como mostrado aqui, pela funcionalização da camada de polímero de um arcabouço de ECM laminado com uma molécula bioativa, as propriedades biológicas inerentes do arcabouço de ECM não são alteradas, ao contrário de métodos convencionais nos quais as moléculas adicionais são incorporadas nos arcabouços de ECM pelo acoplamento com a ECM, diretamente.

Arcabouços de ECM laminados bioativos (por exemplo, arcabouços de FM) nos quais agente bioativo é incorporado em um polímero adesivo (por exemplo, em uma camada polimérica) situado entre camadas sucessivas de ECM possuem várias vantagens críticas sobre composições alternativas, nas quais o agente bioativo é conjugado diretamente com a ECM. Primeiramente, a incorporação do agente bioativo em um polímero ou camada polimérica não altera a composição inerente do arcabouço de ECM, já que não requer a modificação covalente ou química do arcabouço para obter a laminação ou o carregamento com o agente bioativo. Em segundo lugar, o uso de uma camada polimérica bioativa pré-formulada como um veículo para a liberação de um agente bioativo permite maior controle e consistência na uniformidade da dosagem da molécula bioativa.

#### IV. Usos de Composições de Matriz de Pré-estômago

Os arcabouços de matriz do pré-estômago são bem adequados para uma ampla faixa de aplicações na regeneração de tecido. Eles podem ser usados para cobrir falhas de tecido tais como ferimentos e para reforçar e/ou reparar o tecido mole. Eles podem ser usados como folhas isoladas ou laminadas e podem ser formados em dispositivos com conformidade personalizada para se adequar a órgãos particulares, sítios anatômicos ou aplicações cirúrgicas específicas. Os arcabouços de FM são mantidos no local usando qualquer método adequado conhecido na técnica, incluindo suturas, grampos ou curativos.

Em uma modalidade, os arcabouços de FM são usados para cobrir lesões traumáticas extensas ou queimaduras, superando a inconveniência e a complexidade de reunir vários dispositivos de arcabouço menores para obter a cobertura completa. Conseqüentemente, arcabouços de FM particulares da invenção podem cobrir uma lesão ou ferimento que possua uma largura de 10 cm ou mais e um comprimento de 10 cm ou mais.

A presença de uma camada densa de tecido conjuntivo dentro da lâmina própria e a topologia contornada da superfície tornam o FM bem adequado em aplicações de regeneração dérmica e epitelial. A alta resistência a tensão dos arcabouços de FM também é particularmente útil quando o arcabouço é necessário para suportar carga ou é colocado sob tensão. Conseqüentemente, em uma modalidade particular, os arcabouços de FM da invenção são aplicados em lesões ou sítios cirúrgicos onde há a necessidade de estimular o reparo ou a regeneração do tecido ou fornecer um reforço ao tecido. A ECM é naturalmente remodelada ao longo do tempo, tal que os arcabouços de FM são reabsorvidos e substituídos pelo tecido do hospedeiro.

Em outras modalidades, os arcabouços de FM da invenção são usados para substituir válvulas cardíacas lesadas, doentes ou ausentes, artérias, veias bexiga urinária, fígado, porções do trato gastrointestinal ou como moldes para o reparo ou substituição de estruturas da cabeça e do pescoço. FM, em qualquer uma de suas várias formas sólidas ou fluidizadas, pode ser usada como um arcabouço para o reparo da derme ou epiderme, injetada em vários esfíncteres corporais tais como o esfíncter urinário ou esfíncteres esofágicos ou gástricos, dobrado como um tubo ou um tubo parcial como com conduto para a restauração de tecido nervosos ou extrusado ou moldado em qualquer forma adequada para sua aplicação como uma composição regeneradora de tecido. Conseqüentemente, o arcabouço de FM da invenção pode ser suturado no local na forma de uma folha sólida, colocado em lesões ou localizações corporais em forma de gel ou injetado em sua forma líquida ou particulada. Os arcabouços de FM da presente invenção induzem o crescimento de tecidos endógenos incluindo tecidos epitelial e conectivo quando colocados em contato com os tecidos alvo *in vivo*. Adicio-

nalmente, a FM pode ser combinada, opcionalmente, com células para criar construtos de tecido para gerar uma pele nova, tecidos cardiovascular, urogenital, neurológico, fáschia, tendões, bainhas, ligamentos e tecidos gastrointestinais. FM também pode ser semeada com queratinócitos sobre o lado luminal mais denso da matriz e com fibroblastos sobre o lado luminal menos denso para uso em certas aplicações dermatológicas. Os arcabouços de FM podem ser semeados com uma variedade de tipos de células, incluindo células-tronco, para aplicações na medicina regeneradora.

Em outras modalidades, os arcabouços de FM da invenção servem como substrato para o acoplamento *in vivo* de uma cultura celular e como arcabouço para o crescimento celular em aplicações de manipulação de tecido, onde FM pode promover a proliferação e/ou induzir a diferenciação de células eucarióticas. Os protocolos que não utilizam tecido de submucosa de FM em aplicações de cultura celular *in vitro* estão descritos, por exemplo, em U.S. 5.695.998, incorporada aqui por referencia em sua totalidade. Esses métodos são geralmente aplicáveis ao uso de FM como um substrato para a promoção *in vitro* de cultura celular. Em geral, isso envolve contatar FM com células eucarióticas *in vitro* sob condições que conduzam ao crescimento da célula eucariótica. Como descrito aqui, os arcabouços de FM da invenção também podem ser usados para a construção de dispositivos para a liberação de fármaco.

Como aqui descrito, os arcabouços de FM podem aumentar a proliferação de células localizadas próximas ao local de acoplamento do arcabouço. Conseqüentemente, os arcabouços de FM são usados para promover, estimular ou aumentar a proliferação celular em um tecido ou órgão. Em uma modalidade preferida, os arcabouços de FM são usados para promover, estimular ou aumentar a proliferação celular dentro de um tecido lesionado ou uma falha de tecido, por exemplo, dentro de uma lesão regeneradora.

Os arcabouços de FM também promovem a vascularização (por exemplo, angiogênese) dentro de um tecido ou órgão ao qual o arcabouço de FM se adere. Conseqüentemente, os arcabouços de FM podem ser usa-

dos para promover, estimular ou aumentar a vascularização de um tecido ou órgão. Em uma modalidade preferida, os arcabouços de FM são usados para promover, estimular ou aumentar a vascularização dentro de um tecido lesionado ou uma falha de tecido, por exemplo, dentro de uma lesão regeneradora. A melhora da vascularização é uma maneira pela qual os arcabouços de FM promovem o fechamento da ferida e melhoram a qualidade da cicatrização da ferida.

Os arcabouços de FM laminados bioativos aqui descritos possuem várias aplicações clínicas adicionais incluindo, mas não limitadas a liberação de antibióticos (por exemplo, amoxicilina, penicilinas, poliaminas ou quinolinas) em sítios cirúrgicos para tratar, inibir ou prevenir infecção microbiana; liberação de antibióticos em lesões e falhas de tecido para tratar, inibir ou prevenir infecção microbiana; liberação de fatores do crescimento (por exemplo, FGF2, VEGF ou PDGF) em uma lesão ou sítio cirúrgico para promover a regeneração do tecido e/ou a vascularização do tecido; liberação de inibidores enzimáticos para reduzir a atividade proteolítica em lesões crônicas; liberação de análogos do óxido nítrico em uma lesão ou sítio cirúrgico para promover a regeneração do tecido; liberação de antimicrobianos ou agentes antibiofilme em uma lesão ou sítio cirúrgico para inibir ou prevenir a infecção e;ou formação de biofilmes.

Arcabouços de FM da invenção podem ser formulados e usados em uma variedade de formatos incluindo, mas não limitados a pó, emulsão (FM fluidizado), gel ou extrato. Além disso, os arcabouços de FM podem ser esterilizados antes do uso por métodos convencionais, incluindo o tratamento com óxido de etileno, tratamento com radiação gama, esterilização com plasma de gás ou tratamento com feixe de elétrons.

#### V. Arcabouços de FM Laminados Úteis para a Reconstrução da Mama

As características dos arcabouços de tecido de FM da invenção, por exemplo, resistência, elasticidade, retenção da sutura, etc., como aqui descritas, os torna adequados para uma variedade de aplicações nas quais há uma necessidade de suporte ou reforço de tecido mole. Em uma modalidade particular, os arcabouços de tecido de FM são usados para cobrir, po-

sicionar e/ou segurar o tecido nativo da mama ou de próteses mamárias durante a mastopexia (isto é, "levantamento da mama").

O aumento da mama é um procedimento cosmético popular no qual uma prótese, isto é, um implante mamário, é tipicamente posicionado no tórax em uma de três posições: sobre o músculo grande peitoral e sob o tecido da mama (subglandular), parcialmente sob o músculo (submuscular parcial) ou completamente sob o músculo (submuscular). Independente da localização do implante, o resultado estético do procedimento depende amplamente da habilidade do tecido circundante em suportar a prótese, tal que a prótese mantenha sua posição dentro do paciente. Com o passar do tempo, a prótese pode ser deslocada medialmente resultando em simastia; lateralmente, resultando na excursão do implante da cavidade torácica para a axila ou inferiormente, resultando em "queda da mama". Uma causa frequente do mau posicionamento é um suporte inadequado de tecido mole para o peso do implante. O suporte inadequado de tecido mole é comum em pacientes que recebem implantes muito grandes, por exemplo, e em pacientes que perderam muito peso.

Esse problema é exacerbado em pacientes que se submeteram a reconstrução da mama depois do tratamento para câncer de mama, em particular. Os tratamentos de câncer, tais como a radiação ou quimioterapia, enfraquecem o tecido mole necessário para suportar a prótese. Adicionalmente, a obtenção de músculo suficiente ou de cobertura de tecido mole para a prótese depois da mastectomia é um desafio técnico difícil. A viabilidade de obter cobertura adequada é dependente da extensão da perda de tecido e da qualidade do tecido remanescente. Quando a cobertura adequada não é possível, a cobertura é obtida convencionalmente pela transferência de tecido muscular de outro local da paciente, o que pode estar associado com a morbidade do sítio doador, cicatrização deficiente, cicatrizes e contração e o risco de infecção e necrose potencial dos retalhos.

O arcabouço de tecido de FM da presente invenção se dirige para esses problemas pelo fato de que ele pode reforçar o tecido da mama e fornecer um suporte adequado para uma variedade de próteses de mama

durante o aumento/reconstrução da mama. O arcabouço de tecido também pode ser usado para apoiar o tecido nativo da mama ou próteses de mama durante a mastopexia. O suporte adicionado de arcabouço de tecido é fornecido, em parte, pela matriz extracelular derivada do pré-estômago de um ruminante, como descrito aqui.

Arcabouços de FM para reconstrução da mama podem, por exemplo, ser planos ou ter uma forma côncava. Em uma modalidade preferida, o arcabouço de FM tem uma concavidade. Tal concavidade fornece uma conformidade aperfeiçoada e aproximação da forma arredondada do tecido mamário e/ou da prótese de mama, reduzindo o espaço morto e aperfeiçoando o posicionamento, a aposição e fixação do tecido quando comparada com uma folha plana. FM é bem adequada para essa aplicação por que a curvatura natural e a forma do pré-estômago são úteis para a formação de arcabouços de ECM que possuem uma concavidade natural. Adicionalmente, os arcabouços de FM podem ser formados em torno de um molde para alterar a forma como necessário para aplicações particulares (por exemplo, pelo aumento ou diminuição da curvatura do arcabouço).

Arcabouços de FM para reconstrução da mama também podem compreender uma folha simples ou laminada de FM. Por exemplo, múltiplas folhas de FM podem ser laminadas juntas para aumentar a resistência e a espessura do arcabouço, como aqui descrito. A fim de apoiar uma prótese de mama e/ou o tecido nativo da mama, é necessário um arcabouço relativamente resistente. Conseqüentemente, os arcabouços para a reconstrução da mama podem incluir, vantajosamente, uma folha laminada contendo 2 ou mais folhas de FM unidas juntas (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais folhas). As folhas de FM podem ser laminadas usando polímeros, usando pontos ou suturas ou usando ambos, polímeros e pontos ou suturas, como aqui descrito. Em uma modalidade particular, as camadas de arcabouços laminados de FM para a reconstrução da mama são fixadas juntas por uma costura. O uso da costura e/ou polímeros adesivos para laminação de folhas múltiplas de FM garante que o arcabouço de FM retenha sua forma tridimensional antes e durante o implante em um paciente.

O arcabouço de FM também pode ser perfurado ou não perfurado, como aqui descrito. A perfuração reduz o risco do acúmulo de fluido e da formação de seroma sob o implante e permite que as células infiltrem mais facilmente o arcabouço, permitindo o crescimento mais rápido do tecido interno e a remodelagem do arcabouço.

Um arcabouço de FM para a reconstrução da mama pode ter várias formas diferentes a fim de fornecer adequadamente uma cobertura para a prótese de mama durante o aumento da mama ou para o tecido nativo durante a mastopexia. Em modalidades preferidas, um arcabouço de FM tem a forma de um crescente, como ilustrado na figura 2(A), ou uma forma elíptica, como ilustrado na figura 2(B). Uma forma em semicírculo ou de meia-lua também pode ser usada. Em uma modalidade, o arcabouço é suficientemente grande para cobrir completamente ou parcialmente as seções inferior e/ou lateral da prótese de mama ou o tecido da mama. Isso permite que o arcabouço suporte o pólo inferior da prótese de mama e/ou tecido nativo da mama, imitando as dobras mamárias inferior e lateral. Nessa modalidade, o arcabouço pode ser colocado em uma orientação horizontal ou vertical. O arcabouço também pode ser ajustado em uma orientação vertical sobre a lateral ou o lado medial de uma prótese de mama, para inibir o deslocamento lateral ou medial da prótese.

Em modalidades particulares da invenção, o arcabouço de FM para reconstrução da mama tem cerca de 3 cm a cerca de 35 cm de comprimento (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, ou 35 cm), e cerca de 3 cm a cerca de 35 cm de largura (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, ou 35 cm). Um arcabouço de FM exemplificador para a reconstrução da mama tem cerca de 3 cm a cerca de 12 cm de largura e cerca de 25 cm a cerca de 35 cm de comprimento. Tamanhos e formas adequadas adicionais de arcabouços são conhecidas na técnica, como descrito, por exemplo, no WO 2008/016919 e US 2007/0088434 A1, cujos conteúdos estão incorporados aqui por referência em suas totalidades. Essas formas e

tamanhos podem todas ser aplicadas aos arcabouços de FM da invenção.

Quando implantados em um paciente, o arcabouço de FM para a reconstrução da mama sofre uma biodegradação controlada como resultado da substituição de célula viva, tal que o arcabouço original é remodelado. A  
5 infiltração de células de um paciente no arcabouço resulta finalmente na substituição da ECM do arcabouço por uma matriz produzida pelas células infiltrantes. Ao longo do tempo, o arcabouço sofre uma remodelagem construtiva normal, resultando na formação de um novo tecido para apoiar a prótese de mama e/ou o tecido mamário. Essa abordagem elimina a necessida-  
10 de de transferir tecido de um outro local do paciente, especialmente no caso de reconstrução pós-mastectomia, reduzindo dessa maneira a complexidade e a duração do procedimento cirúrgico.

Consequentemente, os arcabouços de FM para a reconstrução da mama aqui descrito podem ser usados em uma ampla faixa de procedi-  
15 mentos que envolvem o aumento da mama ou mastopexia, incluindo, por exemplo, de uma maneira profilática no momento ou no posicionamento inicial de uma prótese de mama, em procedimentos de reposicionamento corretivo subsequentes, na reconstrução pós-mastectomia e nos procedimentos de elevação da mama. Os métodos para usar os arcabouços de tecido nos  
20 procedimentos anteriores são bem conhecidos na técnica. Tais métodos envolvem tipicamente a fixação do arcabouço na posição desejada, por exemplo, através das seções inferior e lateral da mama para apoiar o pólo inferior de uma prótese de mama/tecido de mama ou sobre a lateral ou lado medial da mama para inibir o deslocamento lateral ou medial. A fixação pode ser ob-  
25 tida usando qualquer método adequado conhecido na técnica, por exemplo, pela colocação de suturas ou grampos ou com o uso de um dispositivo aderente. Ao longo do tempo, o arcabouço de FM se torna integrado no tecido circundante. Outras técnicas exemplificadoras para uso em arcabouços de tecido artificial na reconstrução da mama são descritas, por exemplo no WO  
30 2008/016919 e US 2007/0088434 A1, cujos conteúdos estão incorporados aqui por referência. Tais técnicas são igualmente aplicáveis aos arcabouços de tecido de FM da invenção nos procedimentos de reconstrução da mama.

## VI. Isolamento de Arcabouços de Tecido de Órgãos de Mamíferos usando o Fluxo Osmótico Transmural Selado (STOF)

Arcabouços de matriz extracelular são produzidos, tradicionalmente, a partir de tecido gastrointestinal (por exemplo, estômago glandular e intestino delgado) ou de tecido urogenital (por exemplo, bexiga) pela remoção das células epiteliais e da mucosa muscular tanto fisicamente quanto pela separação química antes ou depois do tecido ser imerso em soluções de processamento. A separação física da camada mucosa remove, tipicamente, o epitélio, a membrana basal, a camada glandular e a maior parte, se não toda, da lâmina própria e túnica muscular.

O processo de decelularização remove os componentes antigênicos do arcabouço, enquanto conserva a atividade biológica assim como a integridade mecânica e estrutural da ECM. Os métodos físicos de remoção de célula incluem, convencionalmente, o congelamento rápido, força mecânica, agitação e sonicação. Os agentes químicos convencionalmente usados para a decelularização incluem tratamentos alcalinos e ácidos, detergentes não iônicos (por exemplo, Triton X-100), detergentes iônicos (por exemplo, SDS, Triton X-200), detergentes zwitterionicos (por exemplo, CHAPS, SB-10, SB-16), Tri(n-butyl)fosfato, tratamentos hipotônicos e hipertônicos e agentes quelantes (por exemplo, EDTA, EGTA). Os métodos de processamento enzimático convencionalmente usam tripsina, dipase, endonuclease e exonuclease.

Os métodos de processamento usados até agora imergem tanto o órgão intacto aberto quanto uma seção do órgão em uma sequência de soluções de processamento, expondo dessa maneira todas as superfícies a cada uma das soluções. As características diferentes do tecido muscular e epitelial podem significar que uma solução que tem efeito positivo sobre uma camada de tecido, pode ter um impacto negativo sobre outra camada de tecido. Isso geralmente resulta no uso de múltiplas etapas de processamento, prolongando o tempo de processamento. Todas as soluções de processamento terão um impacto sobre a composição bioquímica, ultraestrutura do tecido e comportamento mecânico da ECM remanescente. Tempos de processamento mais curtos são desejáveis, por que a exposição prolongada

aos agentes de processamento, por exemplo, Triton X-100, SB-10, SB-16, Triton X-200, SDS e tripsina pode ser prejudicial a ECM. Tempos de processamento mais curtos permitem maior eficiência, melhoram os custos econômicos do processamento e reduzem a exposição a proteases celulares, que podem danificar a ultraestrutura nativa da ECM. Os métodos de processamento usados até agora recaem na difusão das soluções de processamento através do tecido, o que pode ser intensificado algumas vezes com a agitação e temperatura aumentada. Conseqüentemente, o processamento do tecido em temperaturas fisiológicas encurta o tempo de processamento com relação ao processamento a 4°C. Entretanto, as temperaturas fisiológicas aumentam a atividade das proteases endógenas e, dependendo da solução usada, podem estimular o crescimento de contaminantes microbianos.

A presente invenção supera esses obstáculos e fornece um método aperfeiçoado para a produção de arcabouços de ECM a partir de tecidos ou órgãos de mamíferos. De acordo com o método da invenção, soluções diferentes são isoladas sobre cada lado do tecido, permitindo que cada solução seja otimizada para atingir as respectivas camadas de tecido. Uma solução é preparada de maneira a ser hipertônica ou hipotônica com relação a outra solução, tal que quando as soluções são expostas a lados opostos de um tecido ou órgão (por exemplo, os lados luminal e abluminal), um fluxo osmótico transmural através da parede é estabelecido. Esse método de processamento auxilia na decelularização, separação de camadas de tecido e remoção de restos celulares e de agentes de processamento. Adicionalmente, esse método reduz efetivamente os tempos de processamento.

Os métodos da invenção aqui descritos, nos quais é estabelecido um fluxo osmótico transmural através da parede de um órgão, são referidos como "Fluxo Osmótico Transmural Selado" (STOF). Os métodos STOF podem ser usados para processar quaisquer tecidos humanos ou de animal intactos ou selados para separar e/ou decelularizar as camadas de tecido e para dessa maneira extrair os arcabouços baseados em ECM. Conseqüentemente, esse método pode ser usado para processar o tecido do pré-estômago de um ruminante para produzir arcabouços de FM ou para pro-

cessar qualquer outro tecido de mamífero. Uma modalidade exemplificadora, não limitante do método STOF está ilustrada na figura 3. Essa figura mostra um órgão que foi preenchido com uma solução, selado e imerso em outra solução. A diferença na salinidade entre as duas soluções resulta em um

5 fluxo osmótico transmural. Será observado que um gradiente osmótico pode ser estabelecido em qualquer direção pela alteração da colocação das soluções (isto é, soluções hipertônicas e hipotônicas). O gradiente é estabelecido, preferencialmente, em uma direção que mimetize o fluxo natural do órgão. Por exemplo, quando se processa o tecido do pré-estômago de um ru-

10 minante, o gradiente é estabelecido preferencialmente da superfície luminal para a abluminal do tecido. O uso da biomimética para determinar a direção sobre a qual estabelecer o fluxo transmural permite que a fisiologia natural e as propriedades do fluxo do tecido aperfeiçoem o processamento.

O método STOF da invenção é particularmente útil para o processamento de tecidos que são difíceis de delaminar, tais como aqueles que

15 possuem um epitélio escamosos estratificado queratinizado, por que ele permite que as camadas de tecido sejam atingidas por agentes específicos. STOF pode ser usado para processar qualquer tecido ou órgão intacto ou parcialmente intacto, que possa ser selado tal que um fluxo osmótico transmural possa ser criado. Isso inclui, por exemplo, tecidos ou órgãos de ori-

20 gem gastrointestinal, urogenital, cardiovascular ou dérmica. Essa abordagem pode ser usada para processar uma ampla faixa de tecidos ou órgãos usando várias soluções de processamento, incluindo, mas não limitadas aquelas que contêm sais, (por exemplo, NaCl, KCl, EDTA, EGTA), detergentes (por

25 exemplo, Triton X-100, Triton X-200, dodecil sulfato de sódio, deoxicolato de sódio, CHAPs, sulfobetaína, tri(n-butil)fosfato) e enzimas (por exemplo, tripsina, endonucleases e exonucleases). Consequentemente, esse método pode ser adaptado para uso com qualquer tecido ou órgão de animal ou hu-

30 mano que possa ser moldado, tal que o tecido ou órgão ou uma porção desses, seja selado para permitir a criação de um gradiente osmótico transmural. Um gradiente osmótico transmural também pode ser estabelecido através de uma seção de tecido que isole uma solução em um recipiente de uma

segunda solução na qual ela está imersa.

O método STOF funciona muito bem em baixas temperaturas, por que o fluxo é dirigido por um gradiente osmótico ao invés de ser dependente da difusão e do movimento Browniano. A rápida eficiência desse método em baixas temperaturas é particularmente vantajosa pelo fato de minimizar a degradação intrínseca por protease de componentes biológicos do arcabouço de ECM e também por prevenir o crescimento microbiano. Em uma modalidade, o método é realizado em uma temperatura de menos do que 6°C (por exemplo, 2°C – 4°C) em menos do que 36 horas (por exemplo, preferivelmente em 24 horas ou menos). Esse método foi usado eficazmente, por exemplo, para delaminar o epitélio escamoso estratificado queratinizado do pré-estômago de um carneiro a 4°C em menos do que 24 horas. Por comparação, processos para gerar um arcabouço de matriz acelular de esôfago que foram relatados previamente demoraram mais do que uma semana (veja, por exemplo, Bhrany *et al.*, "The Development of an Esophagus Acellular Matrix Tissue Scaffold", *Tissue engineering* (2006) 12(2), incorporado aqui por referência). Esse aperfeiçoamento é possível por que o fluxo osmótico transmural direciona as soluções de processamento através do tecido. Em outra modalidade, o método é realizado em temperatura ambiente ou próximo dela (por exemplo, 18°C – 24°C). Em temperatura ambiente ou próxima dela, os tempos de processamento podem ser adicionalmente reduzidos. Por exemplo, o processo STOF foi utilizado para decelularizar e delaminar o pré-estômago de um ovino em temperatura ambiente em menos do que 6 horas. O processo STOF também transmite o benefício de tratar as diferentes superfícies do tecido com diferentes soluções que são otimizadas para remover a camada objetivada (por exemplo, músculo ou epitélio).

As propriedades do fluxo osmótico transmural são tais que a quantidade de fluido que passa através do tecido é dependente da área da superfície. A área da superfície do tecido pode ser controlada pela quantidade de líquido encapsulado dentro dele (o nível de distensão). Consequentemente, um tecido ou órgão pode ser completamente ou parcialmente distendido para aumentar adicionalmente a área da superfície do tecido exposta

ao gradiente osmótico e, dessa maneira aumentar o fluxo osmótico que passa pelo tecido ou órgão.

O método STOF da invenção pode ser usado para remover toda ou parte de uma única camada ou de múltiplas camadas do tecido a ser processado. Por exemplo, todo ou parte do epitélio, membrana basal ou túnica muscular e suas combinações podem ser removidos durante ou depois do processamento. Várias soluções diferentes podem ser empregadas, dependendo do tecido a ser processado e da composição das camadas do tecido que devem ser delaminadas. Em uma modalidade, uma solução hipertônica é encapsulada dentro de um órgão ou tecido e o tecido ou órgão é imerso em uma solução hipotônica. Em outra modalidade, uma solução hipotônica é encapsulada dentro de um órgão ou tecido e o tecido ou órgão é imerso em uma solução hipertônica. Em ambos os casos, a direção do fluxo osmótico será da superfície do órgão em contato com a solução hipotônica para a superfície em contato com a solução hipertônica.

A solução hipertônica pode conter um ou mais tampões, detergentes, sais ou suas combinações. Igualmente, a solução hipotônica pode conter um ou mais tampões, detergentes, sais ou suas combinações. Em todas as circunstâncias, a solução hipertônica contém uma concentração de soluto maior do que a solução hipotônica. Por exemplo, uma solução salina hipertônica contém uma quantidade de sal maior do que uma solução hipotônica. Em uma modalidade preferida, a solução hipertônica contém uma quantidade de sal maior do que o órgão a ser processado, e a solução hipotônica contém uma quantidade de sal menor do que o órgão a ser processado.

Em uma modalidade particular, a solução hipertônica contém NaCl. Concentrações adequadas de NaCl variam, por exemplo, entre cerca de 0,5 M a 10 M (por exemplo, cerca de 0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, 3 M, 3,5 M, 4 M, 4,5 M, 5 M, 5,5 M, 6 M, 6,5 M, 7 M, 7,5 M, 8 M, 8,5 M, 9 M, 9,5 M ou 10 M). Em uma modalidade exemplificadora, a solução hipertônica contém cerca de 4 M de NaCl.

Em outra modalidade particular, a solução hipotônica contém Triton X-200 e EDTA. As concentrações adequadas de Triton X-200 na solução

hipotônica variam, por exemplo, entre cerca de 0,001% e 1% (por exemplo, cerca de 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75% ou 1%). As concentrações adequadas de EDTA na solução hipotônica variam, por exemplo, entre cerca de 0,01% e 1% (por exemplo, cerca de 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75% ou 1%). Em uma modalidade exemplificadora, a solução hipotônica contém cerca de 0,028% de Triton X-200 e cerca de 0,1% de EDTA.

Em outra modalidade particular, a solução hipotônica contém SDS. As concentrações adequadas de SDS na solução hipotônica variam, por exemplo, entre cerca de 0,001% e 1% (por exemplo, cerca de 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75% ou 1%). Em uma modalidade exemplificadora, a solução hipotônica contém cerca de 0,028% de SDS. Em uma modalidade particular, a solução hipotônica contém cerca de 0,028% de Triton X-200, 0,1% de EDTA e 0,1% de SDS. Em outra modalidade particular, a solução hipotônica contém cerca de 0,028% de Triton X-200, 0,1% de EDTA e 0,028% de SDS.

Depois que o processamento inicial de um órgão é obtido pela encapsulação de uma solução dentro do órgão, seguida pela imersão do órgão em uma segunda solução, tal que um gradiente osmótico transmural através da parede do órgão seja estabelecido, o processamento adicional é possível (mas não necessário) pela remoção do órgão da segunda solução e imersão do órgão em uma terceira solução, tal que o fluxo osmótico transmural seja novamente restabelecido. A direção do fluxo osmótico transmural é preferivelmente a mesma durante ambos os estágios de processamento (isto é, da superfície luminal para a abluminal ou da superfície abluminal para a luminal). A solução encapsulada dentro do órgão não necessita ser removida antes ou durante o processamento adicional.

Conseqüentemente, em uma modalidade exemplificadora, uma solução hipertônica contendo NaCl (por exemplo, cerca de 4M de NaCl) é encapsulada dentro de um órgão (ou uma porção desse) de mamífero. O órgão é imerso em uma solução hipotônica contendo Triton X-200 e EDTA (por exemplo, cerca de 0,028% de Triton X-200 e 0,1% de EDTA). O órgão é

imerso depois em uma solução hipotônica contendo SDS (por exemplo, cerca de 0,1% de SDS ou cerca de 0,028% de SDS). As soluções são selecionadas com base no efeito desejado que elas transmitem ao tecido processado. Por exemplo, uma solução hipotônica contendo Triton X-200 e EDTA  
5 direciona a ruptura da membrana basal entre o epitélio e a própria submucosa, enquanto que uma solução hipotônica contendo SDS é usada primariamente para obter a decelularização. O uso da solução de SDS em um método STOF acelera a remoção de paredes celulares e resíduos celulares. Conseqüentemente, múltiplas rodadas de processamento por STOF podem  
10 ser usadas para alcançar o benefício transmitido pelas múltiplas soluções de processamento distintas.

Em outra modalidade exemplificadora, o método STOF é usado para separar e decelularizar as camadas de tecido do pré-estômago de um ruminante para gerar FM. O processo pode ser usado, por exemplo, sobre o pré-  
15 estômago de gado, cabras ou carneiros. FM pode ser gerado a partir do rúmen, retículo ou omaso usando o método STOF. Em uma modalidade exemplificadora, o método é usado para gerar FM do pré-estômago de carneiro (*Ovis aries*). A superfície epitelial do pré-estômago é de epitélio escamoso estratificado queratinizado que está firmemente ligado a membrana basal. Ele é adaptado para  
20 resistir ao dano da abrasão, tornando-o difícil de remover usando outros métodos manuais ou mecânicos. Em uma modalidade preferida, o fluxo osmótico transmural é estabelecido através pré-estômago da superfície luminal para a superfície abluminal, mimetizando o fluxo natural do órgão.

Em outra modalidade exemplificadora da invenção, três soluções  
25 em particular são empregadas para uso na separação de tecido e remoção de célula do pré-estômago de uma maneira oportuna usando o método STOF. A Solução A contém cerca de 4 M de NaCl, a Solução B contém cerca de 0,028% de Triton X-200 e 0,1% de EDTA e a Solução C contém cerca de 0,1% de SDS. A Solução A é hipertônica em relação a Solução B e a Solução C. Usando essas soluções para processar o tecido do pré-estômago, o  
30 pré-estômago invertido é preenchido com aproximadamente 10 L da Solução A e pode ser selado com uma presilha. O rúmen preenchido pode então ser

imerso na Solução B por aproximadamente 16 horas. Essa combinação é direcionada para a ruptura da membrana basal entre o epitélio e a própria-submucosa. O fluxo osmótico transmural e a exposição da camada muscular à Solução A induz, adicionalmente, ao enfraquecimento das fibras musculares, auxiliando na separação física. O pré-estômago preenchido também pode ser imerso na Solução C por aproximadamente 4 horas para obter a decelularização.

O método STOF acelera a remoção de paredes celulares e resíduos celulares. O uso do protocolo condensa a duração do processamento com relação aos métodos tradicionais de processamento, já que o fluxo não é limitado simplesmente ao movimento Browniano. Além disso, o processo pode ser realizado em baixa temperatura (por exemplo, 4°C ou menos) para limitar a atividade de proteases endógenas e o crescimento microbiano. A habilidade para processar o tecido em baixas temperaturas e em períodos de tempo curtos possibilita a recuperação de altos níveis de moléculas biológicas nativas da ECM (por exemplo, fatores do crescimento, proteínas fibrilares, proteínas adesivas, glicosaminoglicanos, etc.) no arcabouço finalizado com relação ao processamento usando outros métodos. Consequentemente, o arcabouço de ECM gerado usando o método STOF tem características bioquímicas distintas com relação aos arcabouços isolados por outros processos.

A presente invenção é ilustrada pelos exemplos a seguir que não devem ser interpretados como limitantes.

### Exemplos

#### Exemplo 1: Preparação de Matriz de Pré-estômago (FM) por Fluxo Osmótico Transmural Selado (STOF)

Pré-estômagos de carneiros com menos de dois anos de idade foram fornecidos por um abatedouro local. O pré-estômago foi invertido tal que a superfície epitelial ficou para o lado de fora e a camada muscular ficou para o lado de dentro. Ele foi preenchido, tal que o órgão foi distendido com 10 L de NaCl a 4 M e selado com uma presilha. O pré-estômago foi suspenso em uma solução contendo EDTA 0,1% e Triton X-200 0,028% por 16 horas, depois do que ele foi transferido para uma solução contendo SDS 0,1%

por mais 4 horas. Tomou-se cuidado para garantir que o órgão não contatasse outras superfícies, incluindo uma com a outra, o que poderia limitar o fluxo osmótico. Esse processo permitiu que as soluções com Triton X-200/EDTA e SDS fossem direcionadas através do tecido, induzindo a decelularização e rompendo com eficiência a membrana basal.

O pré-estômago foi removido do processo STOF e o conteúdo esvaziado. Ele foi cortado de maneira a abrir o órgão tal que as superfícies muscular e epitelial pudessem ser delaminadas. Isso pode ser realizado, por exemplo, tanto pela raspagem manual quanto mecânica a fim de isolar o FM.

O FM foi lavado por 30 minutos usando água em temperatura ambiente com agitação e depois foi transferido para ácido peracético 0,1%, NaCl a 1 M em etanol 5%. Isso foi misturado por 60 minutos seguido por 4 etapas de lavagem em água estéril (15 min), PBS pH 7,2 (15 min), água (15 min) e PBS pH 7,2 (15 min). A FM foi liofilizada, embalada assepticamente e finalmente esterilizada com óxido de etileno. Essa modalidade do processo STOF está ilustrada na figura 4. O exame histológico de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (H & E) confirmou que a decelularização foi eficaz. Isso foi verificado depois pela comparação da concentração de DNA no tecido do pré-estômago e no arcabouço de FM. Amostras digeridas com papaína foram incubadas com o corante Hoescht 33258 (10 µg/mL, Sigma – Missouri, USA) e as unidades de fluorescência relativa foram quantificadas usando um leitor de placa de microtitulação. A concentração de DNA total foi calculada a partir de uma curva padronizada de DNA de timo de bezerro (Sigma – Missouri, USA). Como mostrado na figura 5, o conteúdo de ácido nucleico estava significativamente diminuído no arcabouço de FM quando comparado com o tecido do pré-estômago, indicando que o arcabouço de FM estava decelularizado.

#### Exemplo 2: Propriedades de Fluxo e Efeito da Orientação do Tecido durante o método STOF

O experimento a seguir foi realizado para determinar o relacionamento entre a área da superfície do pré-estômago e o fluxo osmótico da passagem de água pelo pré-estômago. Nesse estudo, NaCl a 4 M e água foram usados para estabelecer um gradiente osmótico através do tecido do

pré-estômago. A área da superfície do pré-estômago pode ser aproximada com base na área da superfície de uma esfera ( $4\pi r^2$ ). O volume de líquido no pré-estômago antes e depois de STOF foi usado para calcular a alteração do volume da solução do interior (L). Houve uma correlação linear entre a

5 área da superfície do pré-estômago (grau de distensão) antes de STOF e o fluxo de água dentro do pré-estômago (alteração de volume), como ilustrado na figura 6. Como mostrado nessa, o fluxo osmótico da água que passa por dentro do pré-estômago aumentou com o aumento da área da superfície do pré-estômago selado. Uma redução na taxa do fluxo osmótico foi observada

10 tipicamente ao longo do tempo, com um fluxo maior obtido durante as primeiras 24 horas de STOF.

Como um meio para evidenciar o fluxo através do pré-estômago junto com um gradiente osmótico durante o processamento por STOF, o peso dos pré-estômagos foi medido antes e depois que o fluxo osmótico

15 transmural foi aplicado. A configuração de STOF foi similar àquela descrita no Exemplo 1 e na figura 3. O peso do pré-estômago aumentou durante STOF como consequência do movimento do fluido no tecido. Os pré-estômagos no início do processo pesavam 789 +/- 45 g, enquanto que no final do processo os mesmos pré-estômagos pesavam cerca de 1160 +/- 92

20 g. A passagem do fluido pelo tecido do pré-estômago resultou em ganho de peso já que a hidratação do tecido aumentou. Esses resultados estão ilustrados na figura 7.

A orientação do tecido impactou significativamente os resultados obteníveis com STOF. O estabelecimento de um gradiente osmótico através

25 do pré-estômago na direção do fluxo natural, fisiológico (isto é, fluxo do epitélio para o músculo, por exemplo, da superfície luminal para a superfície abluminal do pré-estômago) resultou na remoção bem sucedida da camada muscular, camada epitelial e células do pré-estômago. Em contraste, quando um gradiente osmótico foi estabelecido contra a direção do fluxo natural fi-

30 siológico (isto é, fluxo do músculo para o epitélio, por exemplo, da superfície abluminal para a superfície luminal do pré-estômago), o tecido tornou-se desidratado e pegajosos e a remoção subsequente das camadas de músculo e

epitélio foi mais difícil. Esses dados estão resumidos na Tabela 2. A direção do fluxo também afetou o aspecto do tecido no final do processamento.

Tabela 2. Orientação do tecido e propriedades do fluxo

Camada interna do tecido	Solução Interna	Camada externa do tecido	Solução Externa	Fluxo transmural	Aspecto do tecido depois de STOF	Facilidade de delaminação
Músculo	0,1% SDS	Epitélio	4 M de NaCl	Músculo → Epitélio	Desidratado	Ruim
Músculo	4 M de NaCl	Epitélio	0,1% SDS	Epitélio → Músculo	Hidratado	Boa
Epitélio	0,1% SDS	Músculo	4 M de NaCl	Epitélio → Músculo	Hidratado	Boa
Epitélio	4 M de NaCl	Músculo	0,1% SDS	Músculo → Epitélio	Desidratado	Ruim

### Exemplo 3: Preparação de Matriz de Pré-estômago Laminado usando Polímeros Adesivos

5

Os arcabouços de FM descritos aqui podem ser formatados como folhas únicas ou podem ser laminados para formar composições laminadas com múltiplas camadas de FM. O exemplo a seguir descreve a preparação de um arcabouço de FM laminado usando um polímero adesivo de colágeno ou uma camada adesiva preparada a partir de álcool polivinílico ou hidroxipropil celulose. Para preparar o laminado ligado por colágeno, um gel de polímero de colágeno foi preparado inicialmente a partir do arcabouço de FM parental. Esse gel de colágeno mantinha as mesmas qualidades bioquímicas como o material parental e sofreu remodelação quando usado como parte de um arcabouço de FM laminado na regeneração de tecido. O gel de polímero de colágeno foi preparado usando a desnaturação pelo calor do arcabouço de FM parental. FM finamente pulverizada (10% peso/volume) foi aquecida a 95°C em água purificada ou PBS por 90 minutos. A mistura foi centrifugada a 10k RPM por 30 minutos a 35°C para remover os particulados e o sobrenadante foi reservado. Durante a repouso e o resfriamento em

10

15

20

temperatura ambiente, a solução se solidificou em um gel. A gelificação da suspensão de colágeno era reversível e, como tal, foi aquecida ( $>37^{\circ}\text{C}$ ) antes da aplicação direta como um gel às folhas de FM como uma camada entre duas (ou mais) folhas. Durante o repouso e a secagem o gel de colágeno laminou efetivamente as folhas de FM para produzir laminados de duas camadas.

Como a camada polimérica contribui para as características de desempenho global do arcabouço laminado, características diferentes de resistência e manuseio do laminado foram produzidas pela alteração da natureza da camada polimérica adesiva. Adicionalmente, alterações na camada polimérica foram usadas para alterar a taxa de hidratação do laminado, sua estabilidade proteolítica e para a liberação de bioativos.

O adesivo de álcool polivinílico e hidroxipropil celulose foi aplicado como filmes secos que reidrataram em contato com o arcabouço de FM úmido. A liofilização subsequente dos laminados contendo álcool polivinílico e hidroxipropil celulose desidratou a camada polimérica para fornecer um sanduíche laminado.

Os laminados de duas camadas foram testados quanto a resistência uniaxial de acordo com o Exemplo 13. Os resultados estão resumidos na Tabela 3. Os arcabouços de FM laminados com álcool polivinílico e hidroxipropil celulose foram significativamente mais resistentes do que os arcabouços de FM laminados com colágeno. Entretanto, a resistência aumentada foi neutralizada por uma diminuição da elasticidade dos arcabouços de FM laminados com álcool polivinílico e hidroxipropil celulose, como refletido por um aumento no módulo de elasticidade e uma diminuição no alongamento máximo. O arcabouço de FM laminado com álcool polivinílico teve melhor desempenho com base na tensão de cedência, uma expressão normalizada para a espessura da amostra.

Esse exemplo demonstra que como a camada polimérica contribui para as características de desempenho global do arcabouço laminado, características diferentes de resistência e manuseio do laminado foram produzidas pela alteração da natureza da camada adesiva polimérica.

**Tabela 3.** Caracterização biofísica de arcabouço de FM laminado com camadas adesivas poliméricas de colágeno, álcool polivinílico e hidroxipropil celulose.

	Espes- sura (mm)	Carga Máxima (N)	Alongamento Máximo (mm)	Rigidez Tan- gencial Máxi- ma (N/mm)	Módulo de Elasticidade (Young) (GPa)	Tensão de Escoamen- to (MPa)
Colágeno	0,306± 0,018	17,945 ± 3,088	19,418± 0,721	1,347±0,262	0,05±0,01	9,77±1,68
Hidroxipropil celulose	0,363± 0,023	23,533 ± 4,000	12,536± 0,382	2,790±0,438	0,096±0,016	10,80±1,84
Álcool poli- vinílico	0,247± 0,012	22,292 ± 1,172	13,502± 0,222	2,385±0,152	0,121±0,01	15,07±0,79

Erros representam os erros padronizados de cinco experimentos

#### 5 Exemplo 4: Arcabouços de FM Costurado em Laminados

Os arcabouços de FM aqui descritos possuem propriedades físicas intrínsecas (por exemplo, tamanho, espessura, resistência) que possibilitam que as folhas de arcabouço de FM sejam costuradas ou suturadas juntas para formar laminados. Os laminados podem ser costurados ou suturados juntos com ou sem um polímero situado entre as folhas individuais de FM. O exemplo a seguir descreve a preparação de um arcabouço laminado de FM com duas camadas pela costura das camadas de FM juntas com um fio de algodão.

Os arcabouços de FM foram costurados juntos usando um fio de algodão para formar laminados de duas camadas. Uma máquina de costura foi usada para criar uma costura reta (aproximadamente 2 mm de comprimento do ponto) através das duas camadas de folhas de arcabouço de FM. O laminado de duas camadas foi costurado junto usando pontos paralelos com aproximadamente 5 mm de distância e percorrendo a extensão do laminado. O teste de resistência uniaxial dos laminados costurados foi conduzido usando o protocolo descrito no Exemplo 13 e os laminados costurados foram comparados com laminados de duas camadas criados usando uma camada adesiva de colágeno polimérico que não tinha sido costurada.

Os resultados são mostrados na Tabela 4. A resistência do laminado costurado superou a do laminado baseado em colágeno, como descrito pela carga máxima e tensão de escoamento. Entretanto, como a resistência aumentou, a elasticidade e o alongamento do laminado costurado foram reduzidas em relação ao laminado baseado em colágeno.

Tabela 4: Caracterização biofísica de arcabouço de FM laminado com colágeno, comparado com arcabouço de FM laminado costurado.

	Espes- sura (mm)	Carga Máxima (N)	Alongamen- to Máximo (mm)	Rigidez Tan- gencial Má- xima (N/mm)	Módulo de Elasticidade (Young) (GPa)	Tensão de Escoamen- to (MPa)
Colágeno	0,306± 0,018	17,945± 3,088	19,418± 0,721	1,347± 0,262	0,05± 0,01	9,77± 1,68
Laminado costurado	0,272± 0,031	24,617± 2,105	13,795± 1,207	2,731± 0,284	0,130± 0,017	15,10± 1,29

Erros representam erros padronizados de cinco experimentos

#### 10 Exemplo 5: Distribuição de Colágeno IV e Laminina em uma Membrana Basal Rompida

O arcabouço de FM obtido de acordo com o processo descrito no Exemplo 1, assim como o epitélio removido durante a delaminação do tecido do pré-estômago, foram fixados pela imersão em formalina 7% tamporada neutra e embebidos em cera de parafina. Seções com uma espessura de 10 µm foram cortadas usando um micrótomo antes que a seção fosse relaxada em água aquecida e montada em lâminas cobertas com APE. As seções foram fixadas às lâminas pela imersão em paraformaldeído por 10 minutos e armazenadas em condições livres de poeira em temperatura ambiente. A parafina das lâminas foi dissolvida pela imersão em quatro lavagens de 5 minutos com xileno 100% e reidratadas através de concentrações decrescentes de etanol antes da imersão em TBS 50 mM (pH 7.4). As peroxidases endógenas foram suprimidas usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% em metanol 70% por 30 minutos. Os procedimentos de coloração foram realizados de acordo com os protocolos de um kit de detecção secundária DAB (Chemicon). As seções foram lavadas três vezes em TBS por 5 minutos de cada vez, segui-

da pela incubação em soro bloqueador por 30 minutos para bloquear a ligação não específica. Subsequentemente, as seções foram incubadas com um anticorpo primário adequado (isto é, um anticorpo que reconhece a laminina ou colágeno IV, tal como um anticorpo primário de coelho anti-ovino), em uma diluição de 1:100 (ambos os anticorpos primários foram otimizados no tecido antes de usar nesse ensaio). As seções foram incubadas com o anticorpo primário em uma câmara umidificada por 30 minutos em temperatura ambiente. As seções foram lavadas depois em TBS contendo Triton X-100 0,1% (TrTBS) e depois duas vezes em TBS por 5 minutos cada. As seções foram incubadas com anticorpo secundário fornecido no kit de detecção secundária DAB, descrito acima, por 10 minutos em temperatura ambiente. As seções foram subsequentemente lavadas uma vez em TrTBS e duas vezes em TBS seguida pela incubação com um conjugado de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, USA) em temperatura ambiente por 10 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes em TBS antes da incubação com o cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) por 1-5 minutos para possibilitar a coloração máxima do antígeno com um mínimo de coloração de fundo. A marcação com DAB foi suspensa pela lavagem das seções em dH<sub>2</sub>O. As seções foram contracoradas depois com hematoxilina, lavadas de novo com água corrente, desidratadas em concentrações ascendentes de etanol, limpas com xileno, montadas usando o composto para montagem DPX e armazenadas em temperatura ambiente até a visualização. Proteínas marcadas aparecem em marrom, enquanto que os núcleos marcados com hematoxilina aparecem em azul. Os controles negativos foram realizados pela omissão da aplicação do anticorpo primário e/ou secundário durante os procedimentos acima. As lâminas foram visualizadas sob um microscópio e as fotos foram tiradas usando o programa AnalySIS.

A imuno-histoquímica do arcabouço de FM revelou que o colágeno IV e a laminina estavam localizadas nas membranas basais epitelial e vascular e também estavam presentes dentro da camada densa da matriz profunda dentro da lâmina própria. A coloração da laminina e do colágeno IV do arcabouço de FM revelou que a membrana basal não era uma superfície

contínua, mas ao invés disso era descontínua ou rompida. Colágeno IV e laminina foram adicionalmente vistos em amostras de epitélio retiradas depois da delaminação do tecido. A coloração do tecido epitelial revelou que o colágeno IV e a laminina estavam localizados em fragmentos da membrana basal. A presença de laminina e colágeno IV em ambas a camada epitelial e a superfície luminal do arcabouço de FM indica que a membrana basal é rompida durante a delaminação do tecido do pré-estômago. O rompimento e a fratura da membrana basal durante o processo leva a liberação do epitélio. Significativamente, a presença de laminina e colágeno IV na camada da lâmina própria do arcabouço de FM fornece uma fonte dessas moléculas importantes de adesão celular durante a regeneração do tecido.

#### Exemplo 6. Ruptura e Fratura da Membrana Basal

A suspensão de um pré-estômago de ovino contendo NaCl em uma solução de processamento hipotônica que contém Triton X-200 0,028% e EDTA 0,1% por 16 horas resultou no desprendimento do epitélio da própria-submucosa subjacente quando a membrana basal foi rompida.

A análise pela imuno-histoquímica de seções retiradas das folhas epiteliais mostrou a presença de colágeno IV e laminina nos remanescentes da membrana basal em ambas, a FM e a camada epitelial desprendida (descrita acima). Baseado no acima, é claro que as soluções de processamento estão rompendo a estrutura da membrana basal, induzindo a membrana basal a fraturar e a camada epitelial ser liberada. Depois do processamento, o epitélio descamado em folhas a partir da própria-submucosa subjacente. Esse "desfolhamento" do epitélio ocorreu depois da imersão em solução de Triton X-200 e EDTA durante o processo STOF.

Western blotting revelou que a laminina, um componente principal da membrana basal, estava sendo liberada na solução durante o processo de STOF. Isso ficou evidente quando soluções de Triton X-200 0,028% ou Triton X-200 0,028% + EDTA 0,1%, foram amostradas durante o processo de STOF. Proteínas presentes nas amostras foram separadas por eletroforese em gel e visualizadas usando um anticorpo antilaminina (figura 8). A laminina foi solubilizada com qualquer uma das soluções que contêm Tri-

ton X-200 0,028% (Bandas 2 e 4, figura 8), mas não por uma solução que contém NaCl (banda 3, figura 8) ou SDS 0,1% (Banda 5, figura 8).

A análise bioquímica do arcabouço de FM e da camada epitelial descamada durante o processamento revelou que a laminina, um componente basal principal estava presente em ambas frações. A laminina em ambos, o arcabouço de FM e o tecido epitelial, foi quantificada usando ELISA de acordo com o Exemplo 7, abaixo. As concentrações de laminina no arcabouço de FM e no tecido epitelial eram de  $5,87 \pm 2,16$  e  $17,3 \pm 1,1$   $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. O fato de que a laminina foi detectada em concentrações relativamente altas no tecido epitelial descamado apoia adicionalmente a observação de que durante o processamento com STOF, a membrana basal do tecido do pré-estômago é fraturada, levando a perda da camada epitelial.

#### Exemplo 7: Composição Bioquímica do Arcabouço de FM

Um estudo íntenso foi empreendido para entender ambos os componentes maiores e menores do arcabouço de FM, por exemplo, arcabouço obtido de acordo com o processo descrito no Exemplo 1. Macroscopicamente, o produto pode ser considerado como uma matriz de colágeno que suporta a infiltração e diferenciação celular. Entretanto, o processo de produção foi desenvolvido de tal maneira a reter os componentes menores biologicamente ativos, por exemplo os fatores de crescimento e os glicosaminoglicanos (GAGs). Esses componentes menores desempenham um papel igualmente importante na cicatrização de lesões e sua presença nos arcabouços de FM transmite propriedades benéficas na cura de lesões ao produto.

Em todos os casos, a composição bioquímica do arcabouço de FM foi comparada com a submucosa de intestino delgado de porco (SIS) e o material bruto, pré-estômago de ovino.

Em todos os casos, as amostras de tecido foram primeiramente congeladas em nitrogênio líquido e moídas em um moedor de tempero para fornecer um particulado fino. O pó foi extraído e analisado quanto a macromoléculas bioquímicas de acordo com procedimentos estabelecidos. A análise bioquímica dos componentes principais está resumida na Tabela 5.

O colágeno solúvel total foi quantificado pela digestão enzimática-

ca das amostras pulverizadas (pepsina 5 mg/ml, ácido acético 0,5 M, 37°C, 16 h), seguida pela centrifugação e análise do sobrenadante usando Sircol® Soluble Collagen Kit (biocolor – County Antrim, UK). O colágeno solúvel total das amostras foi calculado a partir de uma curva padronizada de colágeno I da cauda do rato (Gibco Invitrogen – California, USA). A concentração de colágeno solúvel total era aproximadamente igual no pré-estômago de ovino, arcabouço de FM e SIS.

Embora a quantificação do colágeno solúvel possa representar a abundância relativa do colágeno fisiologicamente disponível, não deve ser levado em consideração os componentes do colágeno insolúveis em pepsina das matrizes. Portanto, para entender o conteúdo de colágeno total das amostras de teste, a análise de hidroxiprolina foi realizada de acordo com procedimentos estabelecidos. As amostras foram hidrolisadas em HCl a 6M (120°C, 60 minutos), depois os resíduos de hidroxiprolina reagiram para formar um pirrol cromóforo que foi quantificado usando a absorbância. O colágeno total foi calculado a partir de uma curva padronizada de hidroxiprolina (Sigma – Missouri, USA), onde foi presumida a proporção de hidroxiprolina para colágeno total de 7,14. Nos arcabouços de FM e SIS, o colágeno era aproximadamente 80-80% por composição. Como esperado, o colágeno solúvel em pepsina representou apenas uma pequena fração do colágeno total presente nas amostras.

O colágeno IV é um componente importante da membrana basal que promove a adesão e proliferação celular. A membrana basal de FM está parcialmente intacta, sugerindo que essa característica possa transmitir propriedades proliferativas benéficas ao produto. O colágeno IV foi solubilizado com SDS 4% (37°C, 16 horas) em tampão de extração, dialisado contra PBS, quantificado usando um ELISA direto, sondado com um anticorpo anti-colágeno IV (Abacus ALS –Queensland, Austrália) e detectado com anticorpo secundário conjugado com HRP (Abacus ALS –Queensland, Austrália). O colágeno IV foi quantificado em relação a uma curva padronizada de colágeno IV bovino parcialmente purificado (Chemicon Millipore – Massachusetts, USA). O colágeno IV representou uma pequena proporção do colágeno total nas matrizes (aproximadamente 2%).

A elastina é uma proteína estrutural importante que forma uma rede de fibras elásticas dentro da ECM para fornecer elasticidade, textura, durabilidade e a habilidade para recuar depois do estiramento. A elasticidade da proteína é transmitida pela reticulação intensa dos monômeros de tropoe-  
5 lastina solúveis para fornecer um arranjo covalente extenso. Devido a sua reticulação extensa com a lisina, a elastina é especialmente insolúvel e, portanto especialmente difícil de quantificar em amostras biológicas. A fim de entender os níveis relativos de elastina, ambas a elastina "solúvel" e "insolú-  
10 vel" foram quantificadas. Amostras de matrizes foram solubilizadas em ácido oxálico 0,25 M (105°C, 16 horas), centrifugadas para peletizar o material insolúvel, depois o sobrenadante foi analisado usando Fastin® Elastin Kit (Bio-  
color – County Antrim, UK), de acordo com as recomendações do fabricante. A elastina solubilizada foi quantificada em relação a uma curva padronizada de elastina bovina parcialmente purificada, A concentração da composição  
15 de elastina solúvel era aproximadamente 10 vezes menos em FM em relação a SIS. A elastina insolúvel foi quantificada usando um ensaio de equilíbrio de massa de acordo com procedimentos estabelecidos. Resumidamen-  
te, as amostras foram extraídas com (1) etanol/éter de dietila (1:1, 15 min, TA °C); (2) DSD 0,3% (16 horas, TA °C) e (3) NaOH a 0,1 M (15 minutos,  
20 100°C). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado depois da etapa de extração. A elastina insolúvel permaneceu depois do procedimento de extração; como tal, o total de elastina insolúvel foi calculado pela comparação do peso seco da amostra antes e depois das extrações. As  
25 concentrações totais de elastina insolúvel eram mais baixas em FM do que em SIS (3,0% e 5,3%, respectivamente).

Moléculas de glicosaminoglicanos (GAGs), incluindo sulfato de heparan e sulfato de condroitina, ligam fatores de crescimento e citocinas e controlam a retenção da água e as propriedades de gel dentro da ECM. As propriedades de ligação de heparan de numerosos receptores da superfície  
30 celular e de vários fatores do crescimento (por exemplo, FGF, VEGF) tornam os GAGs ricos em heparan componentes extremamente desejáveis de arcabouços para o reparo de tecido. GAGs totais foram quantificados usando um

ensaio colorimétrico de ligação ao corante (Blyscan Sulfated Glycosamine Kit; Biocolor - County Antrim, UK), seguido pela digestão com papaína (125µg/mL) das amostras pulverizadas. A concentração de GAG foi calculada a partir de uma curva padronizada de sulfato de condroitina (Sigma – Missouri, USA).

5 SIS tinha concentrações de GAGs sulfatados totais maiores do que o pré-estômago de ovino e FM ( $7.3\pm 0,4$ ,  $3,9\pm 0,1$  e  $0,6\pm 0,1$  mg/g, respectivamente). As concentrações de sulfato de heparan eram de 0,2 mg/g e  $2,1\pm 0,1$  mg/g para FM e SIS, respectivamente. Uma discussão mais detalhada da quantificação de sulfato de heparan é fornecida abaixo. As concentrações de ácido

10 hialurônico (HA) em cada uma das três amostras foram determinadas usando um kit ELISA (Echelon Biosciences – Utah, USA). HA foi encontrado estar presente em baixas concentrações em todas as três amostras.

Um aspecto crítico na produção de FM são as etapas que decelularizam a ECM e dessa maneira reduzem qualquer resposta negativa do

15 hospedeiro ao xeno-enxerto. Tipicamente, a decelularização é obtida através do rompimento mediado por um detergente das membranas celulares, levando a lise da célula e solubilização dos componentes celulares. A presença de ácidos nucleicos foi usada como um marcador substituto para a celularidade das matrizes. Os fragmentos de DNA por si próprios também impõem

20 algum risco de desencadear uma resposta imune mediada pelo hospedeiro. O DNA total foi quantificado usando um ensaio de ligação a corante fluorescente. As amostras digeridas com papaína foram incubadas com o corante Hoescht 3258 (10 µg/mL, Sigma –Missouri, USA) e as unidades relativas de fluorescência foram quantificadas usando um leitor de placa de microtítulo.

25 A concentração de DNA total foi calculada a partir de uma curva padronizada de DNA de timo de bezerro (Sigma – Missouri, USA). A concentração de DNA em FM era menor do que em SIS (0,2% e 0,4%, respectivamente). Como esperado, houve uma redução significativa no DNA em FM em relação ao material bruto de pré-estômago de ovino (0,2% e 2,6%, respectivamente).

30 Os lipídeos teciduais são encontrados primariamente nas membranas celulares e, portanto, oferecem outro representante que pode ser útil na avaliação da extensão da decelularização de matrizes de ECM. O conteú-

do de lipídeos do arcabouço de FM foi determinado usando um equilíbrio de massa depois da extração com éter das amostras. Ambos os arcabouços de FM e SIS tinham aproximadamente 6% de lipídeos na composição, enquanto que o pré-estômago de ovino tinha uma composição de lipídeos de 14,4%.

5 **Tabela 5:** Componentes bioquímicos principais do pré-estômago de ovino e de arcabouços de tecido de FM e SIS.

	Pré-estômago de ovino		FM		SIS	
	(mg/g±SE) <sup>1</sup>	% composição	(mg/g±SE) <sup>2</sup>	% composição	(mg/g±SE) <sup>1</sup>	% composição <sup>3</sup>
Colágeno Total	142,7±9,7	40,5	821,0±9,0	89,72	629,7±39,7	80,6
Colágeno Solúvel	55,3±3,21	- <sup>3</sup>	51,7±3,3	- <sup>3</sup>	48,7±5,3	- <sup>3</sup>
Colágeno III	61,3±0,7	- <sup>3</sup>	196,8±6,9	- <sup>3</sup>	171,5±11,1	- <sup>3</sup>
Colágeno IV	46,6±1,5	- <sup>3</sup>	9,7±2,1	- <sup>3</sup>	6,6±1,1	- <sup>3</sup>
Elastina Solúvel	112,0±15,0	32,0	4,8±0,5	0,53	54,0±6,1	6,9
Elastina Insolúvel	30,9±6,4	8,8	27,5±4,5	3,01	41,4±5,0	5,3
Total de GAGs	3,9±0,1	1,1	0,6±0,1	0,07	7,3±0,4	0,9
Sulfato de Heparan	N.D.	- <sup>5</sup>	0,2	- <sup>5</sup>	2,1±0,1	- <sup>5</sup>
Ácido Hialurônico	1,95±0,02	0,6	0,4±0,1	0,05	1,58±0,11	0,2
DNA	9,0±0,5	2,6	1,7±0,5	0,19	2,7±0,2	0,4
Lipídeos <sup>6</sup>	50,2±2,9	14,4	59,0±5,2	5,7	44,7±4,0	5,7

<sup>1</sup>Erros representam o erro padrão de experimentos em triplicata.

<sup>2</sup>Erros representam os erros padronizados de pelo menos três lotes de produção independentes, testados em triplicata.<sup>3</sup>O percentual da composição baseada no colágeno total a partir da análise de hidroxiprolina excluiu apenas o colágeno III, colágeno IV e colágeno solúvel.<sup>4</sup>N.D. = Não detectado.

10

<sup>5</sup>O percentual da composição excluiu o sulfato de heparan já que ele está incluído no total de GAGs. <sup>6</sup>Como determinado a partir do ensaio de equilíbrio de massa com elastina insolúvel.

15

Os arcabouços de tecido de FM e SIS, assim como o pré-estômago de ovino, foram analisados quanto aos componentes bioquímicos

menores, fibronectina, laminina e os fatores de crescimento VEGF, FGF2, TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2. Os resultados estão resumidos na Tabela 6.

A fibronectina é uma glicoproteína que está distribuída através da ECM e desempenha um papel importante no crescimento, adesão, migração e diferenciação celulares. A fibronectina se liga aos colágenos e heparans e fornece, de modo importante, ligantes para a adesão de receptores de integrina da superfície celular que levam ao acoplamento e proliferação da célula. A fibronectina foi quantificada usando o kit QuantiMatrix Human Fibronectin ELISA (Chemicon Millipore – Massachusetts, USA) depois da diálise das amostras extraídas com SDS 4%. A concentração de fibronectina na FM foi significativamente maior do que em SIS,  $13,67 \pm 1,64$  e  $5,00 \pm 0,05$   $\mu\text{g/g}$ , respectivamente.

A laminina é uma proteína da ECM que é capaz de se ligar às moléculas de colágeno tipo IV, sulfato de heparan e receptores de integrina, formando assim, conexões importantes entre células e a membrana basal ou a ECM. A laminina foi quantificada em amostras extraídas com SDS 4% usando o kit QuantiMatrix Human Laminin ELISA (Chemicon Millipore – Massachusetts, USA) e as concentrações foram determinadas em relação a um padrão de laminina humana. As concentrações de laminina em FM e SIS eram aproximadamente iguais.

O Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto (FGF2) é multifuncional e desempenha um papel importante na cicatrização de lesões incluindo a promoção da diferenciação da célula endotelial durante a angiogênese e a diferenciação e migração celulares de vários tipos de células. As amostras foram analisadas quanto a presença de FGF2 usando o kit Human FGF-Basic ELISA Development (Peprotech – New Jersey, USA). Amostras de arcabouço foram extraídas com tampão de extração SDS 4% e dialisadas contra PBS. FGF2 foi quantificado usando FGF2 humano como modelo. As concentrações de FGF2 no pré-estômago de ovino e na FM foram menores do que a concentração mostrada em SIS ( $1,70 \pm 1,38$ ,  $0,74 \pm 0,09$  e  $4,85 \pm 0,84$ , respectivamente).

Os fatores de crescimento VEGF, TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2 foram quanti-

ficados usando kits de ELISA comercialmente disponíveis, de acordo com as instruções do fabricante (Bender Medsystems e Peprtech). Primeiramente, FM pulverizado foi extraído usando tanto uréia 2 M (37°C, 48 horas) quanto hidrocloreto de guanidina (37°C, 48 horas). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi filtrado antes da quantificação com ELISA. Os fatores de crescimento TGFβ2 e VEGF também foram quantificados usando Western blot de acordo com procedimentos estabelecidos. Os anticorpos direcionados contra os fatores de crescimento e os controles positivos (onde disponíveis) foram usados apropriadamente; esses incluíam policlonal de coelho anti-TGFβ2 (Abcam®), monoclonal para TGFβ2 (Invitrogen) e policlonal de coelho anti-VEGF (Abcam®). Adicionalmente, TGFβ1 foi quantificado usando dot-blot empregando policlonal de coelho anti-TGFβ1 (Abcam®) e TGFβ1 purificado (Invitrogen) como controle positivo.

**Tabela 6:** Componentes bioquímicos menores do pré-estômago de ovino e de arcabouços de tecido de FM e SIS.

	<sup>1</sup> Pré-estômago de ovino (µg/g±SE)	<sup>2</sup> FM (µg/g±SE)	<sup>1</sup> SIS (µg/g±SE)
Fibronectina	15,30±1,17	13,67±1,64	5,00±0,50
Laminina	6,30±0,24	5,87±2,16	6,00±0,30
FGF2	1,70±1,38	0,74±0,09	4,85±0,84
TGFβ1	N.T	0,19±0,01	N.T
TGFβ2	N.T	0,02±0,01	N.T
VEGF	N.T	0,09±0,03	N.T

<sup>1</sup>Erros representam o erro padrão de experimentos em triplicata.

<sup>2</sup>Erros representam os erros padronizados de pelo menos três lotes de produção independentes, testados em triplicata. N.T. = não testado.

**Exemplo 8:** Arcabouço de FM contém o Glicosaminoglicano (GAG) Sulfato de Heparan

O GAG *N*-sulfatado sulfato de heparan é um GAG importante ligado a ECM que desempenha um papel importante como um cofator para a atividade de FGF2. O sulfato de heparan é necessário para a bioatividade de FGF2 por que ele se liga diretamente aos receptores de FGF2 na presença de FGF2, estabilizando ,portanto o complexo FGF2-receptor. O sulfato de

heparan também se liga a FGF2 livre, estabilizando o fator de crescimento e prolongando sua meia-vida circulante. De acordo com U.S 4.902.508 e U.S 6.099.567, a submucosa do intestino delgado contém sulfato de heparan enquanto que a submucosa do estômago não. A ausência de sulfato de heparan na submucosa do estômago limita qualquer bioatividade associada com FGF2 em arcabouços de FM derivados da submucosa do estômago.

A submucosa do pré-estômago foi analisada para determinar a presença de sulfato de heparan. Amostras de FM digeridas com papaína foram resolvidas por eletroforese em gel de acetato de celulose para GAG de acordo com procedimentos estabelecidos. Os GAGs presentes na amostra de FM migraram similarmente a uma amostra padronizada de sulfato de heparan, mas não como o sulfato de condroitina B ou ácido hialurônico. Pela análise da densitometria do gel corado com Alcian blue, foi possível quantificar a quantidade de sulfato de heparan na amostra de FM. A concentração de sulfato de heparan era de aproximadamente 0,2 mg/g.

Os níveis de sulfato de heparan também foram determinados usando métodos mais quantitativos. GAGs totais foram quantificados em FM usando o kit de detecção Blyscan GAG, como descrito acima. Usando essa abordagem, foi possível determinar a concentração total de GAGs (ambos os GAGs *N*-sulfatados e *O*-sulfatados) em uma amostra, incluindo sulfatos de condroitina (4- e 6-sulfatados), sulfatos de queratan (sensíveis a álcali e formas resistentes), sulfato de dermatan (contendo ácido idurônico e glicurônico) e sulfatos de heparan (incluindo heparanas). Com uma modificação do procedimento foi possível clivar os polímeros de sulfato de heparan *N*-sulfatados em seus monômeros constituintes na presença de GAGs *O*-sulfatados usando tratamento com ácido nitroso. Dessa maneira é possível quantificar o sulfato de heparan como um percentual do total de GAGs presentes na amostra. Usando essa abordagem, foi mostrado que SIS tinha uma concentração de sulfato de heparan de  $2,1 \pm 0,1$  mg/g. Sob condições idênticas, o sulfato de heparan não foi detectado nem em FM nem no tecido do pré-estômago de ovino.

É possível que a modificação pelo ácido nitroso para o ensaio

Blyscan seja ineficaz na resolução de sulfato de heparano em extratos de FM. Como tal, métodos alternativos foram explorados para verificar a presença de sulfato de heparano na matriz de FM.

A presença de sulfato de heparano foi confirmada pela digestão com heparanase de um extrato de GM antes da análise de GAG total usando o ensaio Blyscan. Um extrato de FM tratado com papaína foi digerido em seus dissacarídeos constituintes usando heparano liases I (0,5 mU), II e III (ambas 0,5 mU) (Seikagaku Corporation, Japão) a 37°C por 24 horas. Depois de 24 horas, uma digestão adicional com liase foi realizada para garantir a digestão completa da amostra. As amostras antes e depois da digestão com a liase foram analisadas quanto ao total de GAG usando o ensaio Blyscan. Os dissacarídeos não são reativos ao ensaio Blyscan. Os resultados estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Digestão de extratos de FM por heparanase

Tratamento com Liase	Sulfato de Heparano (50 µg/mL)	Extrato de FM (µg/mL)	Extrato de FM (mg/g)	Concentração de sulfato de heparano sensível a liase
Não tratado	52	70	0,7	NA
24 horas	15	42	0,4	0,3
48 horas	13	46	0,4	0,2

A digestão com heparano liase da amostra reduziu significativamente a concentração total de GAGs, como determinado usando o ensaio Blyscan (Tabela 7). Por exemplo, a concentração de padrões de sulfato de heparano (preparados com 50 µg/mL) antes e depois da digestão pela liase era de 52 µg/mL e 15 µg/mL, respectivamente. Não houve diferença significativa nas amostras tratadas por 24 ou 48 horas, sugerindo que a digestão pela liase estava essencialmente completa depois das primeiras 24 horas de incubação. A digestão pela liase de um sulfato de heparano padronizado reduziu a reatividade da amostra ao reagente de Blyscan, mas não dos níveis de fundo. Isso pode ser explicado pela presença de GAGs adicionais no heparano padronizado que não são sensíveis a digestão pela heparanase e/ou que a digestão pela heparanase não é 100% eficiente na conversão de

heparanos em seus dissacarídeos constituintes. A digestão por heparano liase de extratos de FM reduziu significativamente o total de GAGs presentes nas amostras digeridas (por exemplo, 70 µg/mL, 42 µg/mL antes e depois da digestão pela liase, respectivamente). Baseado nessa análise, o sulfato de heparano sensível a liase representa aproximadamente 40% do total de GAGs presentes em FM. Isso representa uma concentração de sulfato de heparano de 0,2 mg/g, presumindo que a concentração total de GAG anterior a digestão pela liase fosse de 0,7 mg/g. Esse achado está em concordância com a análise de eletroforese em gel descrita acima, onde as concentrações de sulfato de heparano foram determinadas como sendo 0,2 mg/g.

Os extratos de FM foram analisados adicionalmente por HPLC para estabelecer a presença de sulfato de condroitina, outro GAG importante que pode ser esperado estar presente na matriz de FM. Um extrato de FM digerido por papaína (20 horas a 37°C) foi digerido com 5 U/L de condroitinase ABC (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão Tris (50 mM, pH 8,0, acetato de sódio 0,4 M, BSA 0,1%) para hidrolisar o polímero de condroitina em seus monômeros constituintes, isto é, condroitina não sulfatada, 6-sulfato de condroitina, 4-sulfato condroitina, 2,6-sulfato de condroitina, 2,4-sulfato de condroitina e 2,6-sulfato de condroitina. A amostra digerida pela condroitinase também foi analisada por HPLC, através do que a concentração de monômeros de condroitina no extrato foi usada para inferir a concentração de sulfato de condroitina antes da digestão pela condroitinase. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado por RP-HPLC. Injeções (20 µL) foram feitas em uma coluna Phenosphere® SAX 5 µm (Phenomenex – California, USA) a 22°C. A mistura foi resolvida usando um gradiente de HCl aquoso (pH 3.5)/NaCl 1,5 M em HCl (pH 3.5), em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. Os picos foram detectados a 232 nm.

Usando esse método de HPLC, nenhum dos monômeros esperados de sulfato de condroitina foi detectado, sugerindo que o sulfato de condroitina não é um componente principal do total de GAGs detectados em FM.

Juntos, esses achados implicam em que o sulfato de heparano

está presente no arcabouço de FM, mas em concentrações menores do que aquelas encontradas em SIS (Tabela 8). É interessante notar que a concentração total de GAG em FM foi determinada em  $0,6 \pm 0,1$  mg/g, sugerindo que outros componentes dos GAG, excluindo o sulfato de condroitina, podem estar presentes no extrato que não foi resolvido por eletroforese em gel.

Tabela 8: Quantificação de sulfato de heparano usando a hidrólise com ácido nitroso e a detecção com azul de 1,9-dimetil-metileno.

	Pré-estômago de ovino	FM	SIS
Sulfato de Heparano (mg/g)	N.T.	0,2 <sup>1</sup>	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Como determinado pela análise de eletroforese em gel e ensaio Blyscan de extratos pré-tratados com liase.

<sup>2</sup> Como determinado pelo ensaio Blyscan de extratos pré-tratados com ácido nitroso.

<sup>3</sup> Erros representam o erro padrão de experimentos em triplicata.

N.T. = Não testado.

#### Exemplo 9: Estrutura Bimodal de Arcabouço de Tecido de FM

FM de ovino foi preparada usando o método delineado no Exemplo 1. A submucosa do estômago glandular de ovino também foi preparada a partir da submucosa do estômago glandular pela delaminação do músculo e do epitélio da submucosa e depois imergindo o arcabouço em água por duas horas para lisar as células. Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) foram preparadas para histologia usando técnicas padronizadas.

(i) Aspecto Macroscópico: A submucosa do estômago glandular tinha um aspecto macroscópico similar em ambas as superfícies luminal e abluminal. Ao contrário, o arcabouço de FM tinha diferenças visíveis nos contornos da superfície entre os lados luminal e abluminal da matriz. As papilas no lado luminal mostraram topologia acentuadamente similar com o tecido reticulado da pele normal, enquanto que o lado abluminal, deixado para trás quando a túnica muscular é removida, era liso. A natureza bimodal desse arcabouço é importante em termos de suas interações com diferentes

tipos celulares em uma situação de cicatrização.

(ii) Histologia: A camada própria-submucosa é exclusiva do pré-estômago de ruminantes e não presente em outro tecido gastrointestinal. A lâmina própria do estômago glandular e do intestino delgado é uma camada areolar frouxa entre as glândulas da mucosa que é predominantemente removida durante o processo de delaminação. Uma camada de tecido denominada de lâmina muscular mucosa separa a lâmina própria e submucosa no intestino delgado e no estômago glandular. A lâmina muscular mucosa está ausente no rúmen do pré-estômago e, conseqüentemente, a lâmina própria e a submucosa se unem para formar a própria-submucosa. O arcabouço de FM consistiu dos remanescentes da membrana basal e da própria-submucosa. A análise do arcabouço pela microscopia revelou que a FM tinha uma camada densa de ECM dentro da lâmina própria da própria-submucosa que era responsável por aproximadamente 20% da parte superior da espessura da matriz. O lado abluminal do arcabouço de FM tinha uma estrutura reticular mais aberta. O arcabouço de FM tinha uma superfície luminal contornada e uma lâmina própria densa sobre o lado luminal, enquanto que sobre o lado abluminal a ECM da submucosa era mais aberta e reticular. Conseqüentemente, os arcabouços de FM tinham uma estrutura bimodal. Essa estrutura torna a FM bem adequada para estimular a regeneração epitelial sobre o lado luminal denso da matriz e a invasão de fibroblastos sobre o lado abluminal menos denso da matriz, quando usada como um dispositivo médico para a regeneração tecidual.

(iii) Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM): Micrografias eletrônicas de varredura de FM e submucosa de estômago glandular foram feitas em tecidos liofilizados de um bezerro com uma semana de vida e um cordeiro com 6 meses de vida para comparar as superfícies luminal e abluminal. O arcabouço de FM de cordeiro foi preparado usando o método aqui descrito. A própria-submucosa de pré-estômago "não processado" foi preparada pela remoção das camadas epitelial e muscular, mas não empreendendo o processo STOF sobre o tecido. A submucosa do estômago glandular foi preparada a partir do estômago glandular de cordeiro pela delaminação do

músculo e do epitélio da submucosa e depois imergindo o arcabouço em água por duas horas para lisar as células. A comparação das imagens de SEM de FM de bovino recém-nascido, FM de ovino e estômago glandular indicam claramente que FM tem duas superfícies distintas e tem uma unila-  
 5 teralidade clara, enquanto que a submucosa do estômago glandular é muito similar em ambos os lados.

Imagens transversais de SEM de FM e submucosa de estômago glandular demonstraram a presença de uma camada espessa, densa de ECM sobre a superfície luminal da própria-submucosa de FM, comparada  
 10 com a estrutura mais fina e uniforme da submucosa do estômago glandular. Notavelmente, a camada densa de ECM está ausente da submucosa do estômago glandular.

#### Exemplo 10: Área da superfície da Matriz de Tecido de FM

Seis pré-estômagos e seis estômagos glandulares de cordeiros  
 15 com seis meses de idade foram coletados de um abatedouro local. Macroscopicamente, o pré-estômago é um órgão substancialmente maior do que o estômago glandular e, portanto, é idealmente adequado para a produção de arcabouços de grande área superficial.

Para comparar a diferença no tamanho, os respectivos volumes  
 20 do pré-estômago e do estômago glandular foram medidos. Foi encontrado que os pré-estômagos tinham aproximadamente 12 a 15 litros de volume, enquanto que os estômagos glandulares eram limitados a 2,5 a 3 litros. Baseado na aproximação para a área superficial de uma esfera, isso representa aproximadamente  $405 \text{ cm}^2$  para o pré-estômago comparado com  $104 \text{ cm}^2$   
 25 para o estômago glandular.

A Tabela 9 resume as diferenças entre arcabouços de ECM derivados de pré-estômago de ovino e estômago glandular. As dimensões típicas dessas folhas de ECM são mostradas na Tabela 9 para ilustrar a diferença aproximada nas dimensões dos arcabouços obtidos do pré-estômago  
 30 e do estômago glandular. Também foi notado que a matriz da submucosa glandular tem uma estrutura frágil, delicada e foi difícil de isolar, enquanto que FM era muito mais robusto e fácil de obter.

**Tabela 9:** Comparação da área superficial de pré-estômagos de ovino e estômagos glandulares

	Pré-estômago	Estômago glandular
Volume (mL)	13.000	3.000
Área Superficial (cm <sup>2</sup> )	2678	1014
Largura típica da folha de ECM (cm)	15	8
Comprimento típico da folha de ECM (cm)	27	17
Área da folha de ECM típica (cm <sup>2</sup> )	405	104
Comentários	Fácil de separar camadas de tecido para produzir FM, ECM espessa e robusta	Difícil separar as camadas de tecido, ECM fina e friável, que dificulta produzir grandes folhas intactas

Uma vantagem significativa de FM sobre outras composições conhecidas é que grandes construtos podem ser produzidos a partir de um único órgão (por exemplo, o pré-estômago). Por exemplo, para um animal de qualquer idade ou peso corporal, as folhas de FM produzidas a partir do pré-estômago são tipicamente 3 a 4 vezes mais largas do que aquelas produzidas a partir do estômago glandular, o que por sua vez são tipicamente mais largas do que aquelas que são produzidas a partir da bexiga. Folhas de ECM obtidas de órgãos tubulares tais como o intestino delgado são limitadas pela circunferência do órgão. Por exemplo, a submucosa do intestino delgado de porcos com peso comercial está limitada a larguras de menos do que 10 cm devido a circunferência do intestino delgado.

**Exemplo 11: Espessura do Arcabouço de FM**

Quatro folhas de arcabouço de FM foram preparadas a partir dos pré-estômagos de quatro cordeiros com 5 a 6 meses de idade, pesando aproximadamente 25 kg. Treze medidas adequadamente espaçadas da es-

peSSura da folha de FM foram feitas em cada uma das quatro amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Espessura de folhas de FM derivadas de quatro cordeiros com 5-6 meses de idade

Folha de Amostra	Medidas ( $\mu\text{m}$ )			
	Min	Max	Média	Número
1	252	375	309	13
2	205	268	230	13
3	270	452	364	13
4	299	463	388	13

5 A submucosa do intestino delgado derivada de porcos pesando mais do que 180 kg (como indicado na US 5.372.821) tem tipicamente apenas 100  $\mu\text{m}$  de espessura. As medidas acima demonstram que cordeiros imaturos que possuem menos do que 20% do tamanho de um porco maduro podem fornecer folhas de ECM que são pelo menos três vezes mais espessas do que aquelas obtidas da submucosa do intestino delgado de um porco. Tais arcabouços mais espessos possuem propriedades vantajosas, tais como maior resistência e maior durabilidade depois do implante *in vivo*. Folhas de arcabouços de FM mais espessas podem ser produzidas com o aumento da idade e do peso do animal.

#### 15 Exemplo 12: Resistência Biaxial do Arcabouço de FM

Amostras de folhas de arcabouço de FM com uma camada foram laminadas usando uma camada de polímero de colágeno, como descrito no Exemplo 3, para fornecer laminados com 2, 3, 4 e 8 camadas. Adicionalmente, a própria-submucosa do pré-estômago e a submucosa do estômago glandular foram isoladas manualmente do pré-estômago e do estômago glandular, respectivamente. Essas amostras "não processadas" não foram expostas ao processo STOF descrito no Exemplo 1.

A resistência a "ball burst" fornece uma medida de uma resistência de biomateriais a uma carga quando uma força biaxial é aplicada. O teste é conduzido pela fixação do material de teste em um orifício circular e for-

quando uma esfera de metal através do centro da amostra até que a amostra se rompa, permitindo que a esfera passe através dela. As resistências relativas de materiais são comparadas usando a força até o ponto de ruptura do material, denominada de "carga de compressão máxima" (Newtons, N).

5 A carga de compressão máxima de uma amostra será dependente da elasticidade e da resistência da amostra, assim como a espessura da amostra. O teste ball-burst determina a resistência biaxial, através da qual as forças são aplicadas igualmente em todas as direções. Em comparação, a resistência uniaxial (veja abaixo) determina a ruptura em apenas uma direção.

10 De acordo com o Standard Test Method for Bursting Strength of Knitted Goods, Constant-Rate-of-Traverse (CRT) Ball-Burst Test (ASTM D 3797-89), uma hemiesfera de aço polido com 24,5 mm foi empurrada contra as folhas de ECM até a ruptura em uma máquina Instron 1122. A carga de compressão máxima foi definida como a força necessária para romper a folha.

15 Pelo menos 6 (n=6) amostras de cada ECM foram testadas. Os resultados são mostrados na Tabela 11 e na figura 9. O arcabouço de FM foi tão resistente quanto a própria-submucosa do pré-estômago não processado ( $92,8 \pm 12,7$  e  $114,3 \pm 8,1$  N, respectivamente) (Tabela 11 e figura 9) e ambos os materiais de ECM de pré-estômago eram substancialmente mais resistentes

20 do que aqueles derivados do tecido intestinal e tecido de estômago glandular.

Tabela 11: Comparação da resistência ball burst de arcabouço de FM e outros arcabouços de ECM

Arcabouço	Carga de Compressão Máxima (N)
Arcabouço de FM de Ovino	$92,8 \pm 12,7$
Submucosa Intestinal de Porcino <sup>c</sup>	$20,1 \pm 0,5$
Submucosa de Estômago não processado de ovino	$20,8 \pm 1,7$
Própria-submucosa de pré-estômago não processado de ovino	$114,3 \pm 8,1$
Própria-submucosa de pré-estômago não processado de ovino <sup>a</sup>	$42,2 \pm 7,7$
Matriz de Bexiga Urinária Porcina esterilizada com EtO <sup>b</sup>	$57,3 \pm 8,9$
Matriz de Bexiga Urinária Porcina esterilizada com feixe de elétrons	$11,3 \pm 1,9$
Submucosa de Bexiga Urinária Porcina	$15,4 \pm 0,5$

- a. Freytes *et al.*, "Effect of Storage Upon Material Properties of Lyophilized Porcine Extracellular Matrix Derived from the Urinary Bladder" (2005) J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. b. Freytes *et al.*, "Uniaxial and Biaxial Properties of Terminally Sterilized Porcine Urinary Bladder Matrix Scaffolds" (2007) J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. c. Patente US No. 6.099.567.

Um aumento dramático na resistência de laminados de FM foi observado quando folhas adicionais foram laminadas para gerar uma série de dispositivos com múltiplas camadas (2, 3, e 4 camadas). Por exemplo, FM de ovino com 4 camadas teve uma carga de compressão máxima de 361,5±24,9 N, enquanto que FM com uma camada teve uma carga de compressão máxima de (92,8±17,2 N), como mostrado na figura 10.

A resistência biaxial de um laminado de FM com 4 camadas foi comparada com os dados publicados de ball burst de produtos comerciais baseados em ECM, Alloderm® (LifeCell Corporation), Strattice® (LifeCell Corporation), e Surgisis® (Cook Biotechnology) (veja Tabela 12). FM com 4 camadas tinha uma resistência de compressão máxima menor do que outros produtos para implante. Entretanto, na comparação das resistências de ball burst é importante considerar também a espessura do material de teste, já que essa dimensão poderá impactar significativamente a carga de compressão máxima observada. Por exemplo, a espessura relatada de Alloderm® era de 1,9±0,13 mm, enquanto que o produto de FM com 4 camadas era aproximadamente 75% mais fino com 0,47±0,01 mm. Levando em consideração as espessuras diferentes dos produtos de ECM e, portanto fazendo uma comparação significativa das resistências biaxiais dos produtos de ECM, a carga de compressão máxima (N) dos produtos foi normalizada para as suas espessuras (mm). Usando essa análise, as resistências biaxiais relativas dos quatro produtos foram encontradas ser estatisticamente similares (veja a Tabela 12 e a figura 11).

**Tabela 12:** Comparação das propriedades de ball-burst de FM com 4 camadas e produtos comerciais para implante baseados em ECM.

	Carga de Compressão Máxima (N±SE)	Espessura (mm)	Carga de Compressão Máxima Normalizada (N/mm±SE)
Arcabouço FM 4 camadas	361,5±24,9	0,47±0,01	773,7±68,6
Alloderm® (Boguszewski, Dymont et al, 2008)	1781,5±80,2	1,9±0,1	937±106,0
Strattice® (Boguszewski, Dymont et al, 2008)	1059,7±181,8	1,49±0,07	711,2±155,4
Surgisis® (inserto embalado)	440±81	0,76	578,9

Erros representam os erros padronizados de pelo menos cinco amostras ou dos dados publicados. Nenhum erro de espessura relatado para Surgisis®.

#### Exemplo 13: Resistência a Tração Unilateral

Medidas de resistência uniaxial da tolerância a força unidimensional de um biomaterial através do que uma tira de material é fixada em ambas as extremidades e forças opostas são aplicadas. A força de ruptura do material é denominada "carga máxima" (N). A carga máxima de uma amostra é dependente da resistência inerente do material de teste, assim como o tamanho e a espessura da amostra de teste. O teste uniaxial foi realizado com uma máquina Instron 1122. As amostras foram cortadas com uma forma de osso de cachorro com uma largura média da substancia de 1 cm, como previamente descrito (veja Freytes *et al.*, "Effect of Storage Upon Material Properties of Lyophilized Porcine Extracellular Matrix Derived from the Urinary Bladder" (2005) J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. e Freytes *et al.*, "Uniaxial and Biaxial Properties of Terminally Sterilized Porcine Urinary Bladder Matrix Scaffolds" (2007) J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater, ambos incorporados aqui por referencia em sua totalidade).

O arcabouço de FM foi preparado de acordo com o Exemplo 1. Adicionalmente, própria-submucosa de pré-estômago e submucosa de estômago "não processadas" foram preparadas manualmente. Essas amostras

não processadas não foram expostas ao processo STOF. Todas as amostras foram montadas no aparelho de teste Instron e empurradas até romper em uma taxa constante de 20 mm/min. Pelo menos oito (n=8) amostras de cada ECM foram testadas.

5 Os resultados, como mostrados na Tabela 13 e na figura 12, demonstraram que a própria-submucosa de pré-estômago não processada é muito mais resistente do que a submucosa do estômago do mesmo animal. Adicionalmente, arcabouço de FM de ovino de animais com 6 meses (aproximadamente 25 kg) era mais resistente do que a submucosa de estômago  
 10 de porco derivada de animais maduros (aproximadamente 50 kg), como relatado na Patente U.S. Nº 6.099. 567. Esses dados indicam que o arcabouço de FM é muito mais resistente do que a submucosa d estômago, independente da idade, e, portanto do peso corporal do animal. Conseqüentemente, FM é menos provável de sofrer danos ou ruptura mecânica quando usada  
 15 como uma folha simples nas aplicações de reforço de tecido em relação a ECM derivada de estômago. Também, quando é desejável obter uma composição com resistência à tração alta pela laminação das folhas de ECM juntas, será considerado que menos folhas de FM são necessárias comparado com outros arcabouços de ECM derivada da região gastrointestinal ou urogenital, tornando esse processo mais simples e mais econômico.  
 20

A resistência inerente de FM também torna o uso de FM isolada de tecido fetal ou neonatal prático, apesar de outras fontes de tecido de submucosas fetal ou neonatal fornecerem tecido que é mais fraco devido a sua finura e estado imaturo.

25 **Tabela 13:** Comparação da resistência uniaxial de arcabouços de ECM

	Carga Máxima (N)
Arcabouço de FM de ovino	31,6±2,7
Submucosa de estômago de ovino não processada	2,5±0,4
Propria-Submucosa de pré-estômago de ovino não processada	17,9±1,2
Matriz de Bexiga Urinária Porcina esterilizada com EtO <sup>a</sup>	4,7±0,8
Matriz de Bexiga Urinária Porcina não esterilizada <sup>b</sup>	5,4±0,5
Matriz de Bexiga Urinária Porcina esterilizada com feixe de elétrons	1,8±0,2

- a. Freytes *et al.*, "Effect of Storage Upon Material Properties of Lyophilized Porcine Extracellular Matrix Derived from the Urinary Bladder" (2005) *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* b. Freytes *et al.*, "Uniaxial and Biaxial Properties of Terminally Sterilized Porcine Urinary Bladder Matrix Scaffolds" (2007) *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*

Adicionalmente aos dados anteriores, a carga uniaxial máxima para arcabouços de FM simples e com múltiplas camadas foi determinada, assim como a rigidez tangencial máxima (N/mm), alongamento até o rompimento (mm), módulo de elasticidade (GPa) e tensão de cedência (MPa). A tensão de rendimento é uma expressão normalizada para as dimensões da amostra de teste e pode ser usada para comparar produtos similares com espessuras diferentes. Essa expressão é uma medida da resistência inerente do material. O módulo de elasticidade ou módulo de Young, é uma medida do potencial elástico do material, ou seja sua habilidade de se deformar sem romper e retornar ao seu estado original. O módulo de elasticidade é uma propriedade intrínseca do material, permitindo assim que amostras de tamanhos diferentes sejam comparadas. Para o módulo de elasticidade, um número inferior indica grande elasticidade. Por exemplo, o módulo da borracha é de 0,01 a 0,1 GPa.

Uma comparação das propriedades de resistência uniaxial de laminados de FM de uma camada até 4 camadas está representada na figura 13. Como esperado, o aumento do estado de laminação e, portanto, a espessura do produto, melhora significativamente a resistência uniaxial e a rigidez. Entretanto, a laminação não altera estatisticamente o alongamento máximo ou o módulo de elasticidade. Isso indica que o processo de laminação aumenta a resistência do produto, mas não altera sua flexibilidade, sugerindo que o manuseio de produtos com 1 ou múltiplas camadas pode ser similar.

A fim de avaliar a resistência uniaxial relativa de produtos de FM de ovino, uma pesquisa na literatura foi realizada para identificar e extrair dados relevantes em relação à resistência de produtos alternativos semelhantes a ECM. As propriedades de resistência uniaxial e a espessura de arcabouços de FM com uma e duas camadas foram comparadas com dados

publicados para os produtos de reparo de dura-máter DuraGuard<sup>®</sup> e Durarepair<sup>®</sup> (Tabela 14 e figura 14). Os arcabouços de FM com 1 e duas camadas tiveram tensão de cedência estatisticamente equivalente ( $10,15 \pm 1,81$  e  $9,77 \pm 1,68$  MPa, respectivamente). Isso é esperado, já que a tensão de cedência é normalizada para a espessura da amostra, tal que duas amostras preparadas com o mesmo material, mas com espessuras diferentes, podem dar tensão de cedência idêntica. Os produtos de FM com 1 e duas camadas tiveram tensão de rendimento similar a Dura-Guard<sup>®</sup> ( $13,5 \pm 3,34$  MPa), e todos os três produtos desempenharam como DuraDerm<sup>®</sup> ( $6,27 \pm 4,20$  MPa). Durarepair, o mais resistente dos produtos, tinha uma tensão de cedência de  $22,7 \pm 2,83$  MPa. Os arcabouços de FM com 1 e duas camadas (modulo de Young de  $0,04 \pm 0,01$  e  $0,05 \pm 0,01$  GPa, respectivamente) tiveram propriedades elásticas melhores do que Dura-Guard<sup>®</sup> e Durarepair<sup>®</sup> ( $0,08 \pm 0,02$  e  $0,07 \pm 0,01$  MPa, respectivamente). DuraDerm<sup>®</sup> demonstrou o melhor potencial elástico (modulo de  $0,002 \pm 0,009$  GPa), mas como observado acima, foi o mais fraco dos produtos pesquisados.

Essa análise sugere que os arcabouços de FM possuem características de resistência e elasticidade que são equivalentes ou melhores que os produtos durais comerciais para reparo concorrentes. Essa análise indica que um arcabouço de FM com 4 camadas tem uma resistência equivalente aos produtos durais comerciais.

**Tabela 14:** Comparação das propriedades de resistência uniaxial de arcabouços de FM com uma camada e duas camadas com produtos de reparo durais comerciais

	Módulo de Elasticidade (Young) (GPa $\pm$ SE)	Tensão de Cedência (MPa)	Espessura (mm $\pm$ SE)
Arcabouço de FM uma camada	$0,04 \pm 0,01$	$10,15 \pm 1,81$	$0,25 \pm 0,01$
Arcabouço de FM duas camadas	$0,05 \pm 0,01$	$9,77 \pm 1,68$	$0,31 \pm 0,01$
DuraDerm <sup>®</sup> (Sclafani, McCormick et al. 2002)	$0,002 \pm 0,009$	$6,27 \pm 4,20$	$1,4 \pm 0,2$
Dura-Guard <sup>®</sup> (Zerris, James et al. 2007)	$0,08 \pm 0,02$	$13,5 \pm 3,3$	$0,400 \pm 0,001$
Durarepair <sup>®</sup> (Zerris, James et al. 2007)	$0,07 \pm 0,01$	$22,7 \pm 2,8$	$0,50 \pm 0,02$

Erros representam os erros padronizados de pelo menos cinco amostras ou dos valores publicados.

Para avaliar a adequabilidade de arcabouços de FM laminados para implante, as propriedades biofísicas dos arcabouços, como as derivadas do teste de resistência uniaxial, foram comparadas com dados publicados similares em relação ao produto comercialmente disponível Alloderm® (veja Tabela 15). É aparente a partir da divulgação dos dados relatados que um consenso sobre a verdadeira resistência e potencial elástico de Alloderm® ainda não foi alcançado na literatura. Isso pode refletir as origens cadavéricas do produto, que levam a irregularidades no produto, incluindo a variabilidade observada na espessura. A tensão de cedência descrita para Alloderm® varia entre  $7,00 \pm 1,00$  a  $16,79 \pm 2,10$  MPa. A fim de fazer uma comparação significativa, o ponto médio dos dados foi calculado como 11,90 MPa, o que é comparável com a tensão de cedência do laminado com 4 camadas ( $11,97 \pm 1,16$  MPa). Os dois módulos de elasticidade descritos para Alloderm® têm uma ordem de magnitude diferente um do outro, tornando a comparação com o produto de 4 camadas difícil. Entretanto, o produto com 4 camadas retém as propriedades elásticas dos produtos com uma e duas camadas e é similar àqueles produtos duros para reparo Dura-Guard® e Durarepair® (veja a discussão acima).

Consequentemente, os estudos aqui realizados indicaram que os arcabouços de FM possuem características de resistência equivalentes ao material usado na fabricação de Alloderm®. Em particular, os dados indicam que os arcabouços de FM com múltiplas camadas possuem resistência adequada e propriedades elásticas para aplicações em implante, onde a resistência inerente é um requisito do material de implante.

**Tabela 15:** Comparação das propriedades de resistência uniaxial de arca-  
bouço de FM com 4 camadas e Alloderm®

	Módulo de Elas- ticidade (Young') (GPa±SE)	Tensão de Cedência (MPa)	Espessura (mm±SE)
Arcabouço de FM duas camadas	0,06±0,01	11,97±1,16	0,47±0,01
Alloderm®(Lerner, Chaikin et al. 1999)	N.D	16,79±2,10	N,D
Alloderm® (Morgan, McIff et al. 2004)	N.D	10,55±2,37	0,9±0,1
Alloderm® (Choe, Kothandapani et al. 2001)	N.D	7,20±2,56	1,00±0,05
Alloderm® (Vural, McLaughlin et al. 2006)	N.D	15,25±7,13	1,34±0,05
Alloderm® (Gouk, Lim et al. 2008)	0,014±0,0015	7±1	0,45±0,05
Alloderm® (Sclafani, McCormick et al. 2002)	0,001±0,002	8,64±3,31	1,89±0,30

N.D. = sem dados. Erros representam os erros padronizados de pelo menos cinco amostras ou dos valores publicados.

#### 5 Exemplo 14: Resistência de Retenção de Sutura

O teste da retenção de sutura é uma consideração clínica prática que determina a resistência de um biomaterial a retirada da sutura. O protocolo do teste é similar ao da resistência uniaxial, entretanto nesse exemplo uma borda do material de teste foi fixada, enquanto que a outra foi segura com um fixador oposto através de uma sutura colocada através do material de teste. A sutura foi fixada ao biomaterial com uma "profundidade de uma picada", ou seja a distancia do lado da sutura para a borda do material de teste. Forças opostas foram aplicadas em uma taxa constante até que o material se rompeu e a sutura foi arrancada do material de teste, A carga até a ruptura do material, denominada a "carga máxima" (N) é dependente da resistência inerente do material de teste, da profundidade da picada e da espessura da amostra.

Uma série de arca-bouços laminados de FM foram testados quanto a retenção da sutura. Como esperado, a laminação das folhas de FM

5 aumentou a resistência do produto para a retirada da sutura, como mostrado na figura 15. Por exemplo, a carga até a ruptura de FM com uma camada foi de  $5,91 \pm 0,60$  N, enquanto que o arcabouço de FM com 4 camadas mais resistente (como determinado pelo teste uniaxial e ball burst, acima) forneceu uma carga até a ruptura de  $15,96 \pm 1,30$  N.

10 Como visto na figura 15, a resistência de retenção da sutura observada é dependente da espessura da amostra. Portanto, a fim de comparar a resistência de retenção da sutura de laminados de FM de ovino com produtos comerciais usando os dados publicados, a carga máxima para a espessura da amostra foi normalizada. Uma análise comparativa de arcabouços de FM e produtos duros para reparo Durarepair® e Dura-Guard® é mostrada na Tabela 16 e figura 16. A resistência de retenção da sutura de arcabouços de FM com uma camada ( $4,7 \pm 0,4$  N) e duas camadas ( $7,1 \pm 0,5$  N) foi menor do que Dura-Guard® ( $10,02 \pm 1,35$  N) e Durarepair® ( $12,38 \pm 2,10$  N). Entretanto, levando em consideração a espessura relativa dos quatro produtos através da retenção de sutura normalizada, os quatro produtos possuem um potencial equivalente de resistir a retirada da sutura.

15 Tabela 16: Comparação da resistência de retenção da sutura de arcabouços de FM e matrizes duros para reparo comercialmente disponíveis.

	Retenção da Sutura - Carga Máxima (N±SE)	Espessura (mm±SE)	Retenção da Sutura Normalizada (N/mm)
Arcabouço de FM uma camada	4,7±0,4	0,25±0,01	18,9±1,5
Arcabouço de FM duas camadas	7,1±0,5	0,31±0,01	23,2±1,6
Dura-Guard®(Zerris, James et al. 2007)	10,02±1,35	0,40±0,01	25,1±3,4
Durarepair® (Zerris, James et al. 2007)	12,38±2,10	0,50±0,02	24,76±5,19

20 Erros representam o erro padrão de cinco amostras ou os dados publicados.

O estudo comparativo foi estendido para determinar o desempenho dos arcabouços de FM laminados em relação aos produtos para implante comercialmente disponíveis Alloderm®, Strattice® e Surgisis®. Os resulta-

dos são mostrados na Tabela 17 e na figura 17. É importante notar que enquanto o padrão da ASTM para o teste de retenção da sutura prescreve uma profundidade da picada de 2 mm, várias profundidades de picada foram empregadas através desse estudo, entre cerca de 2 mm a cerca de 10 mm (Tabela 17). O aumento da profundidade da picada usada durante o teste aumentou a carga máxima observada já que mais força é necessária para extrair a sutura através da amostra até que a borda seja alcançada e a extração seja observada. O arcabouço de FM laminado com 4 camadas foi significativamente mais resistente a extração da sutura do que o produto Surgisis<sup>®</sup> (resistências de retenção da sutura normalizadas,  $34,2 \pm 2,8$  e  $18,0$  N/mm, respectivamente). As resistências de retenção da sutura relatadas para ambos Alloderm<sup>®</sup> e Strattice<sup>®</sup> empregaram uma modificação para o padrão ASTM, usando uma profundidade da picada de 10 mm (Tabela 17). As resistências de retenção da sutura normalizadas desses produtos foram de  $71,2 \pm 10,71$  e  $40,2 \pm 3,43$  N/mm, respectivamente. Em comparação, a resistência de retenção da sutura normalizada do arcabouço com 4 camadas foi de  $34,2 \pm 2,8$  N/mm, usando uma profundidade de picada de 2 mm. Esses dados indicam que a resistência de retenção da sutura do arcabouço de FM com 4 camadas pode provavelmente ser equivalente a ambos, Alloderm<sup>®</sup> e Strattice<sup>®</sup>, se todos os três produtos fossem testados em experimentos lado a lado usando profundidades de picada equivalentes. Essa noção é apoiada pela observação de que o arcabouço de FM com 4 camadas tem uma tensão de cedência similar sob o teste uniaxial (veja Tabela 15) e que os três produtos possuem resistências de ball-burst normalizadas similares (veja Tabela 12).

**Tabela 17:** Comparação da resistência de retenção da sutura de arcabouços de FM laminados e matrizes para implante comercialmente disponíveis

	Retenção da Sutura - Carga Máxima (N±SE)	Espessura (mm±SE)	Retenção da Sutura Normalizada (N/mm)	Profundidade da picada (mm)
Arcabouço de FM 4 camadas	16,0±1,3	0,47±0,01	34,2±2,8	2
Alloderm® (Boguszewski, Dymant et al. 2008)	135,2±11,1	1,9±0,13	71,2±10,71	10
Strattice® (Boguszewski, Dymant et al. 2008)	59,9±2,3	1,49±0,07	40,2±3,43	10
Surgisis® (Oasis Product Insert)	13,7±3,2	0,76	18,0	2

Erros representam os erros padrão de pelo menos cinco amostras ou dos dados publicados. Nenhum erro relatado para Surgisis®.

#### 5 Exemplo 15: Índice de Permeabilidade Hidrostática (PI) do Arcabouço de FM

A permeabilidade de arcabouços de ECM implantáveis pode influenciar a taxa de infiltração celular e difusão das moléculas para dentro e a partir do implante exógeno. A permeabilidade desejada o implante dependerá da aplicação. Por exemplo, dispositivos de implante para substituição dural devem geralmente ser relativamente impermeáveis para proteger contra a perda potencial de fluido cérebro-espinhal. Os implantes para a reconstrução de tecido requerem uma permeabilidade relativamente maior para permitir a troca vantajosa de fatores do crescimento e a infiltração celular e para liberar o exsudato da lesão. Portanto, idealmente, as tecnologias de arcabouço de tecido, tal como aquela fornecida pela presente invenção, permitem que a permeabilidade seja ajustada conforme necessário pela aplicação alvo.

A fim de avaliar a extensão da permeabilidade aquosa de produtos de FM de ovino simples e com múltiplas camadas, os índices de permeabilidade (PI) foram determinados usando um equipamento para teste de

permeabilidade hidrostática, de acordo com procedimentos estabelecidos (Freytes, Tullius et al. 2006). Dado que o arcabouço de FM é anisotrópico, possuindo faces derivadas da junção epitelial e da junção muscular, o presente estudo procurou determinar se o arcabouço de uma camada tinha uma permeabilidade diferencial dependendo da direção do fluxo através do material anisotrópico. A permeabilidade diferencial como resultado da "lateralidade" de ECM biologicamente derivada foi observada previamente. A Tabela 18 compara a permeabilidade do arcabouço de FM com uma camada com os índices de permeabilidade publicados para ECM derivada de matriz de bexiga urinária de porco. Os resultados mostraram que o arcabouço de FM era permeável a soluções aquosas. Notavelmente, o arcabouço de FM com uma camada era aproximadamente 10 vezes menos permeável do que a matriz de bexiga urinária e ambas as direções.

O presente estudo foi prolongado para determinar a permeabilidade aquosa da dura bovina nativa e de arcabouços de FM com 1 e 4 camadas. A dura foi extraída de uma vaca com aproximadamente 2 anos de idade e a membrana dural testada quanto a permeabilidade usando o procedimento estabelecido. A dura é considerada ser uma membrana relativamente impermeável já que ela evoluiu para proteger o sistema nervoso central do mamífero contra vazamentos e invasão de corpo estranho. A permeabilidade da dura foi similar a do arcabouço de FM com uma camada ( $0,0022 \pm 0,0003$  e  $0,0031 \pm 0,0005$  mL/cm<sup>2</sup>/min, respectivamente), enquanto que o arcabouço de FM com 4 camadas foi aproximadamente 10 vezes menos permeável ( $0,00010 \pm 0,00001$  mL/cm<sup>2</sup>/min). Portanto, o arcabouço com uma camada fornece a vantagem de ter uma permeabilidade muito similar a da dura nativa. A diferença entre arcabouços de FM com duas camadas e 4 camadas provavelmente reflete uma propriedade do polímero usado para laminar as folhas. Portanto, os produtos laminados subsequentes podem ser desenvolvidos com uma permeabilidade "ajustada", uma característica que pode ser particularmente relevante para produtos para implante dural.

**Tabela 18:** Índices de permeabilidade dos arcabouços de FM com 1 e 4 camadas, comparados com matriz de bexiga urinárias e dura bovina

	Índice de Permeabilidade (mL/cm <sup>2</sup> /min)		proporção
	luminal→abluminal	abluminal→luminal	
Arcabouço FM uma camada	0,0031±0,0005	0,0025±0,0006	1,23
Matriz de bexiga urinária (Freytes, Tullius et al. 2008)	0,08±0,03	0,02±0,08	4,00

Arcabouço FM 4 camadas	0,00010±0,00001	N.A
Dura Bovina	0,0022±0,0003	N.A

Erros representam os erros padrão de pelo menos cinco amostras ou dos dados publicados. N.A, = não aplicável.

5 **Exemplo 16: Eficácia in vivo do arcabouço de FM em um modelo de cicatrização de lesão em roedor**

O estudo a seguir foi realizado para mostrar a eficácia de FM na cicatrização de lesão. A matriz do pré-estômago preparada a partir de um bezerro com 1 semana de idade foi cortada em implantes elípticos (25 x 12  
10 mm). Doze ratos Lewis com idade entre 20-23 semanas com um peso médio de 370 g foram obtidos. A pele dos ratos foi desinfetada com clorexidina 0,5% e etanol 70%. Foi criada uma lesão de espessura total com uma agulha para biópsia de 12 mm estéril depois de medir a borda craniana para estar a 6 cm da base do crânio ao longo do eixo espinhal. A matriz foi implan-  
15 tada de maneira a cobrir a lesão e se prolongar subcutaneamente sob a pele na margem craniana. PBS estéril foi usado para reidratar a matriz e a lesão foi coberta com Intrasite Gel (Smith and Nephew). Seis ratos lesionados si-  
20 milarmente foram tratados com salina estéril como um controle. Nos primeiros 4 dias do experimento, os ratos tratados com FM tiveram uma taxa de fechamento mais rápida comparada com os controles, Depois desse perío-

do, a taxa de cicatrização da lesão com FM foi menor comparada com os controles, presumivelmente por que o arcabouço reduziu o grau de contração da lesão. Aos 23 dias, as lesões tratadas com FM e as lesões de controle não tratadas eram menores do que 20% do tamanho original. Não houve evidência de reação inflamatória ou imune para a FM na lesão ou na região do implante subcutâneo.

Exemplo 17: Eficácia in vivo de Arcabouço de FM em um modelo porcino de cicatrização de lesão

A fim de avaliar o desempenho in vivo de um arcabouço de FM e determinar sua eficácia na estimulação da regeneração do tecido e a habilidade para sofrer remodelagem, um estudo abrangente de cicatrização de lesão em um sistema de modelo porcino foi conduzido. O modelo de cicatrização de lesão porcina é geralmente considerado ser um modelo animal bem aceito para estudar o processo de cicatrização de lesões e a eficácia de intervenções clínicas ou terapêuticas (Lindblad 2008). Isso por que a cicatrização da derme do porco lembra muito o processo de cicatrização em humanos. Por exemplo, a contratura da lesão é o mecanismo dominante de fechamento de lesão em roedores, enquanto que em porcos e seres humanos o fechamento da lesão ocorre predominantemente através do preenchimento do déficit de tecido (Lindblad 2008).

É importante observar que apesar do presente estudo ter focalizado um modelo porcino de cicatrização de lesão aguda, o arcabouço de FM da presente invenção pode ser usado AM ambas as indicações aguda e crônica. O estudo ocorreu como se segue. No dia 0, um total de 20 lesões de espessura total com 20 mm de diâmetro foram criadas cirurgicamente sobre o dorso de um porco fêmea anestesiada com 6 semanas de idade (aproximadamente 18-20 kg) com um punção dérmico. As lesões foram criadas em quatro colunas de 5 fileiras espaçadas por uma distancia de 3 cm, como mostrado na figura 18. Um total de cinco animais foi usado no estudo (100 sítios de lesão no total).

Cada uma das lesões ou não foi tratada ou foi tratada tanto com FM com uma camada estéril, FM laminado com duas camadas quanto com o

produto baseado em ECM estabelecido, SIS. Em cada caso, uma peça circular de um dos arcabouços anteriores (20 mm de diâmetro) foi aplicada à lesão e reidratada *in situ* pela aplicação de salina estéril. A fim de calcular qualquer desvio posicional, a localização dos quatro tratamentos foi alterada entre cada animal, tal que dois animais não receberam o mesmo esboço de tratamento. Lesões tratadas e não tratadas foram cobertas de modo idêntico.

Nos dias 0, 3, 7, 14, 28 e 42, todas as lesões foram digitalmente fotografadas e a área e a profundidade da lesão (altura, se apropriado) foram registradas. Adicionalmente, uma única fileira de lesões de cada animal foi biopsiada. A biópsia foi retirada cirurgicamente e incluiu o leito da lesão assim como uma porção de tecido normal das margens da lesão. Todas as biópsias foram fixadas em formalina, montadas, cortadas e coradas para análise. Os tecidos seccionados foram corados com os corantes H&E, Verhoff Von Gieson e tricromico de Gomori. Os tecidos também foram corados usando imuno-histoquímica com marcadores de diferenciação celular, endotelização e resposta imune.

#### (A) O arcabouço de FM é remodelado e infiltrado com células durante a cicatrização da lesão

Um exame das biópsias de tecido fixado retiradas durante o curso do estudo indicou que o arcabouço de FM foi infiltrado por células durante o processo de cicatrização. As matrizes de FM aparecem como fitas verdes nas seções coradas com tricrômico de Gomori e as matrizes de ECM eram especialmente proeminentes do dia 7. As células eram claramente visíveis dentro do arcabouço exógeno de ECM no dia 7. Ambas as matrizes de arcabouço de FM e do produto comercial SIS foram visíveis por aproximadamente 14 a 28 dias, depois do que as matrizes estavam completamente degradadas e o colágeno maduro foi depositado em um processo de remodelagem.

#### (B) Persistência do arcabouço de FM em lesões tratadas

A persistência de arcabouços de FM no modelo porcino de cicatrização de lesão foi avaliada. A fim de qualificar a persistência dos tratamentos com ECM na cicatrização das lesões, seções de tecido coradas com

Verhoff van Gieson (elastina) foram examinadas quanto ao aspecto da matriz ou de fragmentos da matriz em cada uma. Nas seções coradas para elastina, os arcabouços (FM com uma e duas camadas ou SIS) apareceram como fitas de vermelho para preto que podiam ser claramente distinguidas da lesão em regeneração. A persistência de arcabouços nos pontos de tempo amostrados está resumida na figura 19.

Nos pontos de tempo mais precoces (dias 3 e 7), o arcabouço era claramente visível no 1/3 superior da lesão, tipicamente em associação com o epitélio em regeneração e/ou crosta. Conforme o tempo passou, o arcabouço pareceu estar migrando para o leito da lesão e sofrendo degradação. Houve pouca diferença na longevidade dos três tratamentos com arcabouço, tal que pelo dia 14-28 o arcabouço estava ausente da maioria das lesões. Nenhuma matriz era visível no dia 42.

(C) O arcabouço de FM promove a proliferação celular dentro de lesões em regeneração em uma extensão maior do que a matriz derivada da submucosa do intestino delgado

A proliferação celular dentro da lesão em regeneração pode ser um indicador útil da eficácia do tratamento de uma lesão, já que a proliferação celular é um indicativo de uma resposta imune benéfica e de migração e proliferação de fibroblasto e/ou queratinócito. A fim de quantificar a proliferação celular, a imuno-histoquímica do tecido biopsiado obtido durante o estudo de cicatrização de lesão de porco descrito acima, foi realizada usando o marcador celular Ki67. Ki67 é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular e, portanto é um marcador útil da proliferação celular e atividade célula. Ki67 não é expresso no restante das células.

Tecidos das biópsias fixados em formalina foram montados em parafina e seccionados em 15 µm antes de serem submetidas a recuperação do epítipo com tampão citrato. As células ativas foram detectadas depois usando um anticorpo primário para Ki67 em uma diluição de 1:50, e a coloração foi desenvolvida usando um anticorpo secundário conjugado com HRP e DAB através de Bond Max® Automated IHC/ISH Staining System (Leica Microsystems Instruments). As seções foram levemente contracora-

das com hematoxilina de Mayer. As lâminas imunocoradas foram digitalmente fotografadas com uma ampliação em 40x, com três campos aleatórios tirados da camada epitelial (dias 3, 7, 14, 28 e 42) e três imagens tiradas da camada dérmica em regeneração (dias 7, 14, 28 e 42). Usando o programa ImageJ (National Institute of Health), as imagens foram processadas para quantificar o número de células positivas para Ki67 por quadro. Primeiramente, as imagens foram deconvoluídas para separar a coloração marrom de DAB dos outros componentes de cor presentes na imagem, e depois o fundo foi subtraído através da função limiar. As células positivas para Ki67 foram identificadas como clusters pretos com uma faixa de tamanho de 300-4500 pixels e conseqüentemente contadas.

A quantificação da proliferação celular é mostrada na figura 20, expressa como o número total de células positivas para Ki67 identificadas nos 3 quadros de epitélio e nos 3 quadros dérmicos por seção de tecido. Cada um dos 4 grupos de tratamento foi amostrado nos dias indicados. As células positivas para Ki67 na camada dérmica não foram quantificadas no dia 3 devido a ausência de uma camada dérmica. Geralmente, a proliferação celular dérmica atinge o pico nos dias 7 e 14 para todos os grupos de tratamento. Em ambos os dias 7 e 14, as lesões tratadas com o arcabouço de FM tinha uma proliferação celular significativamente maior do que os grupos tratados com SIS e não tratados (veja figura 20;  $P > 0,01$  one-way ANOVA usando GraphPad Prism). Essa fase proliferativa se resolveu ao longo do tempo com as células positivas para Ki67 retornando a "linha de base" no dia 42 em todos os grupos de tratamento.

#### 25 (D) O arcabouço de FM aumenta a vascularização de lesões cicatrizadas em relação ao arcabouço derivado da submucosa do intestino delgado.

A presença de um suprimento sanguíneo funcional dentro de uma lesão é crítica para o fechamento e cicatrização da lesão. Como tal, aumentar a vascularização de uma lesão em cicatrização tem recebido atenção considerável como um meio de aperfeiçoar as taxas de cicatrização da lesão e qualidade da cicatrização da lesão, especialmente em lesões crônicas. A extensão da vascularização (por exemplo, angiogênese) depois do

tratamento com arcabouço de FM de ovino e arcabouço de submucosa de intestino delgado foi determinada no contexto do modelo de cicatrização de lesão de porco descrito acima. A fim de quantificar a extensão da endotelização e o desenvolvimento da vascularização das lesões cicatrizadas foi empregada a imuno-histoquímica acoplada com métodos de quantificação digital. Os tecidos da biópsia fixados foram seccionados em 15  $\mu\text{m}$ , montados e submetidos a tensoativo tamponado com EDTA. As células endoteliais foram coradas com um anticorpo anti-CD34 em uma diluição de 1:100 e visualizadas usando um anticorpo secundário conjugado com HRP e coloração DAB, antes da contra coloração com hematoxilina de Mayer. As biópsias do tecido retiradas no dia 3 foram excluídas dessa análise devido à ausência de uma camada dérmica claramente definida. As lâminas coradas foram fotografadas digitalmente com uma ampliação de 40x pelo registro de 4 quadros aleatoriamente selecionados da camada dérmica de cada uma das seções do tecido. Usando o programa ImageJ, o canal de cor de DAB (células positivas para CD34) foi deconvoluído a partir de cada uma das imagens. As imagens monocromáticas marrons foram filtradas para remover partículas menores não especificamente coradas e pequenos clusters positivos para CD34 não representativos de vasos sanguíneos ( $<300 \mu\text{m}^2$ ). O número de vasos sanguíneos foi contado depois usando os seguintes critérios: "vasos pequenos" = 300-500  $\mu\text{m}^2$ , "vasos médios" = 500-1500  $\mu\text{m}^2$  e "vasos grandes"  $> 1500 \mu\text{m}^2$ .

O número total médio de vasos contados por quadro é mostrado na figura 21A, para cada um dos 4 grupos de tratamento durante o curso do experimento (dia 3 excluído). Houve um aumento estaticamente significativo no número de vasos sanguíneos em lesões tratadas com qualquer um dos arcabouços de FM de ovino, em relação a lesões não tratadas. O aumento no total de vasos sanguíneos em relação a lesões não tratadas foi evidente nos dias 14 ( $P < 0,01$  FM com uma camada e FM com duas camadas), 28 ( $P < 0,01$  FM com uma camada e FM com duas camadas) e 42 ( $P < 0,01$  FM com uma camada e  $P < 0,05$  FM com duas camadas). Em comparação o tratamento com SIS não aumentou o número total de vasos sanguíneos ao controle não tratado.

O número de vasos pequenos que resultou do tratamento com qualquer um dos arcabouços de FM de ovino foi maior do que aquele que resultou do tratamento com SIS ou dos grupos não tratados no dia 7 e essa tendência progrediu através do decorrer do experimento (figura 21C) o número de vasos sanguíneos de tamanho médio e grande foi aproximadamente igual entre os quatro grupos de tratamento no dia 7 da linha do tempo (figuras 21D e 21E). Os tratamentos baseados em FM de ovino diferiram das lesões tratadas com SIS e não tratadas nos dias 14, 28 e 42 pela existência de um grande número de vasos médios e grandes. Por exemplo, no dia 42, os tratamentos com arcabouço de FM de ovino tinham aproximadamente o dobro do número de vasos grandes em relação às lesões tratadas com SIS e não tratadas (figura 21E).

Pela quantificação do número de vasos pequenos médios e grandes foi possível entender o efeito dos quatro grupos de tratamento sobre a distribuição relativa do tamanho dos vasos resultantes. As proporções de vasos pequenos (~40%), médios (~45%) e grandes (~15%) não se alteraram entre os 4 grupos de tratamentos ao longo da linha do tempo (figura 21B). Esses achados indicaram que os tratamentos com matriz de pré-estomago aumenta o número total de vasos, mas os tratamentos não influenciam a distribuição relativa ao tamanho dos vasos formados.

#### Exemplo 18: Arcabouços de FM laminados bioativos

Arcabouços de FM laminados que foram desenvolvidos incluem um polímero adesivo, como descrito acima. O polímero liga folhas adjacentes de arcabouço de FM para formar uma folha laminada. Esse polímero também pode servir como um veículo para a liberação de moléculas bioativas e pode ser usado para ajustar a liberação das moléculas bioativas no sítio de contato com o tecido, com descrito aqui. Os arcabouços de FM laminados que foram preparados continham um dos seguintes agentes bioativos na camada polimérica: fatores de crescimento FGF2 ou fator de crescimento de nervo (NGF) ou os antimicrobianos doxiciclina, amoxicilina e poli-L-lisina. Os arcabouços laminados de FM que continham a camada polimérica bioativa foram subsequentemente ensaiados para demonstrar a bioatividade do laminado.

Especificamente, um gel de colágeno foi preparado como descrito no exemplo 3. Uma vez formado, o gel foi inoculado com FGF2 recombinante humano ou NGF. Folhas de arcabouço de FM estéreis foram cortadas em discos de 8 mm e o gel de colágeno inoculado com fator de crescimento (10  $\mu$ L) foi aplicado sobre a superfície. Um segundo disco de arcabouço de FM foi aplicado à camada de colágeno para criar um laminado intercalado (isto é, arcabouço de FM/polímero de colágeno bioativo/arcabouço de FM). As lâminas de arcabouço de FM bioativo foram desidratadas a 25°C por duas horas para fornecer um laminado ligado. Os laminados de FM foram produzidos com FGF2 ou NGF tanto com 0,250 quanto com 500 ng/disco. Os arcabouços de FM bioativos foram incubados a 37°C por 24 horas em DMEM (1 mL) para extrair o fator de crescimento ligado antes da aplicação a uma monocamada de células. Células PC12 foram semeadas em placas de 24 poços a 20k células/poço em DMEM (1 mL) e incubadas por 24 horas a 37°C. O meio foi removido das células e substituído por DMEM (1 mL) que tinha sido incubado com os laminados de arcabouço de FM bioativo. Células de controle positivo foram tratadas tanto com uma solução de FGF2 quanto de NGF em uma concentração final de 50 ng/ml. As células foram incubadas por 48 horas. Depois desse tempo, uma monocamada de células foi fotografada (três quadros por poço) usando um microscópio invertido. O total de células foi contado por quadro assim como o número total de processos celulares por quadro. Processos celulares são indicativos de diferenciação celular estimulada por fatores de crescimento exógenos. Os processos celulares foram definidos como extensões celulares a partir do corpo da célula que possuem um comprimento que é dobro da largura do corpo da célula. A diferenciação estimulada pelo fator de crescimento foi expressa como o número de processos celulares por célula por quadro. Os resultados estão expressos na Tabela 19. Ambos os laminados inoculados com NGF e FGF2 desencadearam uma resposta celular das células PC12. Adicionalmente, a resposta foi dependente da dose, tal que a resposta celular de laminados inoculados com 500 ng de fator de crescimento (FGF2 ou NGF) foi maior do que os laminados inoculados com 250 ng.

**Tabela 19:** Quantificação da bioatividade de laminados de arcabouço de FM contendo FGF2 e NGF

	Laminado inoculado com FGF2 (ng/disco)			rhFGF2 controle (50 ng/disco)
	500	250	0	
Resposta celular relativa	0,60± 0,01	0,39± 0,02	0,09±0,02	0,72±0,02

	Laminado inoculado com NGF (ng/disco)			rhNGF controle (50 ng/disco)
	500	250	0	
Resposta celular relativa	0,59± 0,04	0,41± 0,02	0,11± 0,02	0,73± 0,01

Erro representa o erro padrão de pelo menos 6 amostras

Os discos de arcabouço de FM laminado também foram preparados contendo ou a molécula pequena antimicrobiana doxiciclina ou o polímero poli-L-lisina como descrito acima pela inoculação de um gel de colágeno com o bioativo requerido. Os discos inoculados com doxiciclina foram preparados com concentrações finais de 30, 15, 5, 2,5, 1 e 0 µg/disco, enquanto que os discos inoculados com poli-L-lisina foram preparados com 5, 2, 1, 0,5, 0,1 e 0 µg/disco. Os controles positivos foram preparados pela marcação de uma solução tanto com Doxiciclina (concentração final de 30 µg/disco) quanto com poli-L-lisina (concentração final de 5 µg/disco) sobre discos de papel de filtro estéreis. Placas de Ágar de Mueller-Hinton foram preparadas e semeadas com 100 µL de 10<sup>8</sup> *S. aureus* e deixadas secar pó 5-10 minutos. Usando uma técnica estéril, os discos foram transferidos para placas e as placas incubadas por 24 horas a 35°C. Depois de 24 horas, as placas foram fotografadas digitalmente e a zona antimicrobiana de inibição em volta de cada um dos discos foi classificada em relação ao controle positivo. A bioatividade contra o *S. aureus* dos arcabouços de FM laminados é dada na Tabela 20. A bioatividade dos artigos de teste foi classificada, onde "+++" indica bioatividade comparável com o controle positivo, e "-" indica sem bioatividade.

**Tabela 20:** Bioatividade contra *S.aureus* de arcabouços de FM laminados tanto com doxiciclina quanto com poli-L-lisina

Doxiciclina	Concentração do Antibiótico						Controle positivo
µg/disco	30	15	5	2,5	1	0	30
Escore antibacteriano	+++	+++	++	+	-	-	+++

Poli-L-lisina	Concentração do Antibiótico						Controle positivo
µg/disco	5	2	1	0,5	0,1	0	5
Escore antibacteriano	+++	-	-	-	-	-	+++

Discos de arcabouço de FM laminados previamente com um polímero de colágeno contendo doxiciclina foram bioativos contra *S.aureus*. A bioatividade de doxiciclina de arcabouços de FM laminados era dependente da concentração, tal que os discos laminados com 30 µg/disco tiveram uma bioatividade aproximadamente equivalente aos discos de controle, enquanto que os laminados com 1 e 0 µg/disco não demonstraram bioatividade. A bioatividade do arcabouço de FM laminado contendo poli-L-lisina foi menos pronunciada do que os arcabouços laminados de FM com doxiciclina. Entretanto, a bioatividade foi observada na maior concentração testada de poli-L-lisina (5 µg/disco), que foi bem comparável com o disco de controle.

Os resultados desses estudos *n vitro* demonstraram a habilidade das proteínas de fator do crescimento ou moléculas pequenas antimicrobianas e polímeros para se difundir com o tempo a partir da camada adesiva polimérica. Portanto, os resultados indicam que uma folha de FM laminada que contenha uma camada polimérica que compreenda um agente bioativo pode ser usada para uma variedade de propósitos de tratamento. O laminado pode variar entre duas camadas a 15 camadas ou mais (por exemplo, duas a 30 camadas) dependendo das aplicações clínicas específicas e, portanto, da extensão necessária do desempenho físico.

In vivo, o arcabouço de FM laminado bioativo difunde similarmente uma gente bioativo a partir da camada polimérica para os tecidos cir-

cundantes. Pela variação do tipo de camada polimérica e a formulação do agente bioativo dentro dessa camada, a difusão do agente bioativo do laminado para o tecido local pode ser controlada.

Exemplo 19: Biocompatibilidade de Arcabouços de FM de ovino

5 Os arcabouços de FM de ovino foram preparados de acordo com o Exemplo1, cortados como dispositivos de 4 x 4 cm quadrados e finalmente esterilizados usando óxido de etileno. Os dispositivos de arcabouço de FM foram testados quanto a biocompatibilidade de acordo com o Blue Book Memorandum G95-1 e ISO10993-1:2003. O teste incluiu a toxicidade, 10 sensibilização e irritação/reatividade cutânea. Em um esforço para detectar qualquer infecção microbiana que resulte do dispositivo de arcabouço de FM e/ou para detectar qualquer resposta imunológica ou inflamatória, o teste requerido foi expandido para incluir um ensaio de implantação *in vivo* de 30 dias. As concentrações de endotoxina dos dispositivos também foram quan- 15 tificadas.

Todos os dispositivos foram preparados de acordo com ISO10993-12:2007 'Biological Evaluation of Medical Devices, Part 12: Sample Preparation and Reference Materials'. Os resultados do teste de biocompatibilidade estão resumidos na Tabela 21 e indicam que as características 20 de biocompatibilidade dos arcabouços de FM os tornam adequados para a liberação *in vivo*.

Tabela 21: Teste de biocompatibilidade de arcabouço de FM

Teste de biocompatibilidade	Descrição do teste	Resultado
Citotoxicidade	Teste de Citotoxicidade usando o Método de Eluição ISO em uma linhagem celular de fibroblasto de camundongo L-929 de acordo com ISO 10993-5:1999 'Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos, Parte 5: Testes para Citotoxicidade In Vitro	Não citotóxico
Citotoxicidade	Agar Overlay de acordo com ISO 10993-5:1999 'Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos, Parte 5: Testes para Citotoxicidade In Vitro	Não citotóxico
Irritação	ISO 10993-10:2002, Emenda1:2006, 'Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos, Parte10: Testes para Irritação e Hipersensibilidade do tipo Retardada'	Não irritante
Sensibilização	De acordo com ISO 10993-10:2002, Emenda 1:2006, "Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos, Parte10: Testes para Irritação e Hipersensibilidade do tipo Retardada"	Não sensibilizante
30 dias de Implantação	De acordo com ISO10993-6:1994 'Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos, Parte 6: Testes para Efeitos Locais depois do Implante	Não irritante
Teste de Endotoxina	USP<85>, ANSI/AAMI ST72:2002 e normas do FDA	Aprovado

### Exemplo 20: Inativação Viral Durante a Fabricação de Arcabouços de FM de Ovino

A inativação viral durante a produção de arcabouço de FM pode ocorrer como resultado de: 1) desnaturação da proteína viral e/ou ruptura dos lipídeos virais do envelope viral durante o tratamento com detergentes (Triton X-200 e SDS); 2) liberação de espécie de oxigênio reativo durante o tratamento com ácido peracético (PAA); e 3) esterilização final usando óxido de etileno. Um estudo foi desenvolvido para examinar a inativação viral durante o processo STOF e o tratamento com PAA usando três modelos de vírus.

O nível de inativação viral foi testado usando processos de manufatura em escala reduzida. Isso envolveu inocular três estoques virais com título alto de cada um dos três modelos de vírus em amostras que representam dois estágios diferentes do processo de manufatura e submeter essas amostras inoculadas a um tratamento análogo a etapa de manufatura correspondente. O nível de inativação viral durante cada tratamento foi determinado pela comparação dos títulos virais recuperados das amostras inoculadas após cada tratamento, com a recuperação viral de amostras não tratadas.

Os vírus de modelo foram escolhidos para incluir vírus com características físico-químicas diferentes, tais como a presença ou ausência de envelope, tipo de ácido nucleico do genoma (DNA ou RNA) e sobrevivência no ambiente/resistência à desinfecção (Tabela 22). A quantidade de vírus infecciosos presentes nas amostras foi determinada pela titulação final e os títulos virais foram expressos como dose infectante de cultura de tecido, 50% (TCID<sub>50</sub>).

Os sistemas do modelo empregado nesse estudo demonstraram que ambos os tratamentos com STOF e PAA inativaram os modelos virais com uma redução teórica total no título viral de mais do que 6 logs de TCID<sub>50</sub> (Tabela 22).

O tratamento com detergente foi eficaz na inativação dos vírus envelopados (PI-3 e FHV-1), mas mostrou pouco efeito na inativação de ví-

rus BEV não envelopados. Esse resultado era esperado, já que vírus não envelopados não são tipicamente afetados pelo tratamento com detergentes. Ao contrário, o tratamento com PAA foi eficaz na inativação dos três modelos de vírus (Tabela 22).

5 **Tabela 22:** Inativação demonstrada e teórica de três modelos virais durante o processo de produção em escala reduzida de arcabouço de FM

Vírus (família)	Hospedeiro natural	Genoma	Envelope	Resistência	Inativação por STOF (log TCID <sub>50</sub> )*	Inativação por PAA** (log TCID <sub>50</sub> )	Inativação teórica total (log TCID <sub>50</sub> )
PI-3	Bovino	ss(-)RNA	Sim	Sensível	≥4,0*	≥2,3	≥6,3
FHV-1	Felino	ds DNA	Sim	Sensível	≥3,5	≥2,6	≥6,1
BEV	Bovino	ss(+)RNA	Não	Resistente	0,5	7,3	7,3

Abreviações usadas: PI-3: vírus Parainfluenza tipo 3 (Paramyxoviridae); FHV-1: herpesvírus tipo 1 felino (Herpesviridae); BEV: enterovírus bovino (Picornaviridae); TCID<sub>50</sub>: dose infectante de cultura de tecido, 50%; PAA: ácido peracético. \*Inativação de vírus de modelo depois do tratamento com duas soluções detergentes na presença de um gradiente osmótico. Soluções detergentes incluíam EDTA 0,1%/Triton X-200 0,028% e SDS 0,1%. \*\*\* Inativação de vírus de modelo depois do tratamento com PAA 0,3%/Etanol 5% em PBS. Os resultados são expressos como "maior ou igual a" quando o limite inferior de recuperação de vírus foi limitado pela toxicidade das amostras para células de mamíferos.

**Exemplo 21: Fabricação de um Dispositivo para Reconstrução da Mama**

Folhas úmidas de arcabouço de FM naturalmente côncavo foram alinhadas e sucessivamente empilhadas uma sobre a outra para criar laminados com 4 camadas, 6 camadas e 8 camadas. As folhas foram empilhadas uma sobre outra usando uma forma curva que apoiou e complementou os contornos naturais do arcabouço de FM. Os laminados foram liofilizados para fornecer laminados ligados. Esses laminados foram costurados subsequentemente usando um ponto reto com sutura de vicryl, com um comprimento

mento do ponto de aproximadamente 3 mm. Os laminados foram costurados em linha reta acompanhando a curvatura do laminado. As linhas de pontos eram separadas por aproximadamente 10 mm. Os laminados mamários tinham a forma de um crescente ou uma elipse, como ilustrado nas figuras 2A e 2B, respectivamente. Os laminados mamários podem ser afixados ao tecido nativo usando suturas ou grampos.

#### Equivalentes

A invenção foi descrita aqui com referência a certos exemplos e modalidades. Nenhum esforço foi feito para descrever exhaustivamente todos os exemplos possíveis e modalidades da invenção. De fato, aqueles versados na técnica apreciarão que várias adições, deleções, modificações e outras alterações podem ser feitas nos exemplos acima descritos e nas modalidades, sem se afastar do espírito e escopo da invenção como descrita nas reivindicações anexas. É pretendido que todas as tais adições, deleções, modificações e outras alterações sejam incluídas dentro do escopo das reivindicações a seguir.

#### Incorporação por Referência

Os conteúdos completos de todas as patentes, pedidos de patente publicados, websites e outras referências aqui citadas estão incorporados expressamente aqui em suas totalidades por referência.

#### Referências

- Boguszewski, D. V., N. A. Dymant, et al. (2008). Biomechanical Comparison of Abdominal Wall Hernia Repair Materials. ASME 2008 Summer Bioengineering Conference Marriott Resort, Marco Island, Florida, ASME
- Choe, J. M., R. Kothandapani, et al. (2001). "Autologous, cadaveric, and synthetic materials used in sling surgery: comparative biomechanical analysis". Urology 58(3): 482-6.
- Freytes, D. O., R. S. Tullius, et al. (2006). "Effect of storage upon material properties of lyophilized porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder". J Biomed Mater Res B Appl Biomater 78(2): 327-33.

- Freytes, D. O., R. S. Tullius, et al. (2008). "Hydrated versus lyophilized forms of porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder". J Biomed Mater Res A 87(4): 862-72.
- 5 Gouk, S. S., T. M. Lim, et al. (2008). "Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling". J Biomed Mater Res B Appl Biomater 84(1): 205-17.
- 10 Lemer, M. L., D. C. Chaikin, et al. (1999). "Tissue strength analysis of autologous and cadaveric allografts for the pubovaginal sling". Neurourol Urodyn 18(5): 497-503.
- Lindblad, W. J. (2006). "How should one study wound healing?" Wound Repair Regen 14(5): 515.
- 15 Lindblad, W. J. (2008). "Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies". J Biomater Sci Polym Ed 19(8): 1087-96.
- Morgan, A. S., T. McIlff, et al. (2004). "Biomechanical properties of materials used in static facial suspension". Arch Facial Plast Surg 6(5): 308-10.
- 20 Sclafani, A. P., S. A. McCormick, et al. (2002). "Biophysical and microscopic analysis of homologous dermal and fascial materials for facial aesthetic and reconstructive uses". Arch Facial Plast Surg 4(3): 164-71.
- Vural, E., N. McLaughlin, et al. (2006). "Comparison of biomechanical properties of alloderm and enduragen as static facial sling biomaterials." Laryngoscope 116(3): 394-6.
- 25 Zerris, V. A., K. S. James, et al. (2007). "Repair of the dura mater with processed collagen devices". J Biomed Mater Res B Appl Biomater 83(2): 580-8.

## REIVINDICAÇÕES

1. Arcabouço de tecido **caracterizado pelo fato de que** compreende a matriz extracelular da própria-submucosa do pré-estômago de um ruminante.
- 5                    2. Arcabouço de tecido, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** a própria-submucosa é proveniente do rúmen.
3. Arcabouço de tecido, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo fato de que** compreende um ou mais dos seguintes elementos:
- 10                    a) tecido descelularizado selecionado a partir do grupo que consiste em epitélio, membrana basal, túnica muscular, e suas combinações;
- b) uma proteína fibrilar selecionada a partir do grupo que consiste em colágeno I, colágeno III, elastina, e suas combinações;
- c) um fator de crescimento selecionado a partir do grupo que
- 15                    consiste em FGF-2, TGFb1, TGFb2, VEGF, e suas combinações;
- d) um glicosaminoglicano selecionado a partir do grupo consistindo em ácido hialurônico, sulfato de heparano, e suas combinações;
- e) uma proteína adesiva selecionada a partir do grupo que consiste em fibronectina, laminina, colágeno IV, e suas combinações;
- 20                    f) um polímero posicionado entre duas ou mais folhas laminadas.
4. Arcabouço de tecido, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo fato de que**:
- a) o polímero é selecionado a partir do grupo que consiste em colágeno, quitosana, alginato, álcool polivinílico, carboximetil celulose, hidro-
- 25                    xipropil celulose, e suas combinações; e/ou
- b) o polímero compreende ainda uma molécula bioativa.
5. Arcabouço de tecido, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo fato de que** a molécula bioativa compreende uma ou mais das seguintes características:
- 30                    a) a molécula bioativa é dispersa por toda uma camada do polímero;
- b) a molécula bioativa é ligada de forma não covalente ao polí-

mero;

c) a molécula bioativa é ligada de forma covalente ao polímero;

d) a molécula bioativa é uma molécula pequena ou um polipeptídeo;

5 e) a molécula bioativa é selecionada a partir do grupo que consiste em um fator de crescimento, um antimicrobiano, um analgésico, um hemostático, um agente pró-angiogênico, um agente antiangiogênico, e suas combinações; e

10 f) a molécula bioativa é selecionada a partir do grupo que consiste em FGF2, NGF, doxíciclina, poli-L-lisina, e suas combinações.

6. Arcabouço de tecido, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo fato de que** inclui uma ou mais das seguintes características:

15 a) o arcabouço de tecido compreende uma superfície luminal contornada;

b) o arcabouço de tecido é formatado como uma folha única ou laminada; e

c) o arcabouço de tecido compreende de 2 a 12 folhas laminadas.

20 7. Arcabouço de tecido, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo fato de que** a folha única ou laminada compreende uma ou mais das seguintes características:

a) as folhas laminadas são presas juntas por pontos ou suturas;

25 b) a folha única ou laminada tem uma largura de pelo menos 10 cm e um comprimento de pelo menos 10 cm; e

c) a folha única ou a folha laminada tem uma resistência à ruptura média de pelo menos 80N.

8. Arcabouço de tecido, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo fato de que:**

30 a) o ruminante pertence a um gênero selecionado a partir do grupo que consiste em *Capra*, *Bos*, *Cervus* e *Ovis*, ou

b) o ruminante é *Ovis aries*.

9. Composição **caracterizada pelo fato de que** compreende um arcabouço de tecido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

5 10. Arcabouço de tecido, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou combinação, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo fato de que**, são aplicados em um ou mais dos seguintes usos:

- a) induz o reparo de um tecido danificado;
- b) estimular a regeneração de tecido mole;
- 10 c) induzir a proliferação de células dentro de um tecido;
- d) aumentar a vascularização dentro de um tecido;
- e) suportar tecido mamário; e
- f) cobrir um déficit de tecido.

15 11. Arcabouço de tecido, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo fato de que** o lugar sem tecido tem uma largura de pelo menos 10 cm e um comprimento de pelo menos 10 cm.

20 12. Dispositivo de implante para suportar tecido mamário natural e/ou de prótese mamária dentro de um paciente, **caracterizado pelo fato de que** o dispositivo compreende um arcabouço de tecido conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

13. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo fato de que** compreende uma ou mais das seguintes características:

25 a) o dispositivo cobre as seções inferior e lateral do tecido mamário natural e/ou de prótese mamária;

b) o dispositivo é formado como uma folha laminada compreendendo duas ou mais camadas de matriz extracelular ou de 4 a 8 camadas de matriz extracelular;

30 c) o dispositivo tem um formato crescente ou um formato elíptico;

d) o dispositivo tem concavidade.

14. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 13, **caracteriza-**

**do pelo fato de que** inclui uma ou mais das seguintes características:

a) as camadas da matriz extracelular são fixadas juntas por ponto ou sutura;

b) a matriz extracelular é perfurada ou não perfurada; e

5 c) a matriz extracelular contém colágeno.

15 15. Método para separar ou descelularizar as camadas dentro de todo ou de uma porção de um tecido **caracterizado pelo fato de que** compreende a etapa de criar um fluxo osmótico transmural entre dois lados do tecido, de modo que as camadas dentro de todo ou de uma porção do  
10 tecido sejam separadas ou descelularizadas.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo fato de que** o fluxo osmótico transmural é criado a partir do lado luminal para o lado abluminal do tecido.

15 17. Método, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, **caracterizado pelo fato de que** compreende a etapa de remover toda ou uma parte de uma camada de tecido selecionada do grupo que consiste em epitélio, membrana basal, túnica muscular, e suas combinações.

20 18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, **caracterizado pelo fato de que** o tecido compreende um epitélio escamoso estratificado queratinizado.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado pelo fato de que** compreende uma ou mais das seguintes etapas:

25 a) encapsular uma primeira solução dentro do tecido ou de uma porção do mesmo, e imergir o tecido ou porção do mesmo em uma segunda solução que é hipertônica em relação à primeira solução;

b) remover o tecido ou porção do mesmo da segunda solução, e imergir o tecido ou porção do mesmo em uma terceira solução que também é hipertônica em relação à primeira solução;

30 c) encapsular uma primeira solução dentro do tecido ou porção do mesmo, e imergir o tecido ou porção do mesmo em uma segunda solução que é hipotônica em relação à primeira solução; e

d) remover o tecido ou porção do mesmo da segunda solução, e imergir o tecido ou porção do mesmo em uma terceira solução que também é hipotônica em relação à primeira solução.

5 **20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que:**

a) a segunda solução compreende água, incluindo, opcionalmente, pelo menos um tampão, detergente ou sal; e/ou

b) a primeira solução compreende NaCl 4 M.

10 **21. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que:**

a) a segunda solução compreende 0,028% de Triton X-200, 0,1% de EDTA, e 0,1% de SDS;

b) a segunda solução compreende 0,028% de Triton X-200, 0,1% de EDTA, e a terceira solução compreende 0,028% de SDS; ou

15 c) a segunda solução compreende 0,1 SDS, e a terceira solução compreende 0,028% de Triton X-200 e 0,1% de EDTA.

**22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o método é realizado:**

20 i) a uma temperatura entre 2°C e 4°C para a segunda solução e terceira solução conforme (b) ou (c); ou

ii) a 4°C para a segunda solução e terceira solução conforme (b) ou (c); ou

iii) a uma temperatura entre 18°C e 24°C para a segunda solução conforme definido em (a).

25 **23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o método é realizado em menos que 36 horas para (i), em menos de 24 horas para (ii), e em menos de 6 horas para (iii).**

30 **24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 23, caracterizado pelo fato de que o tecido compreende uma ou mais das seguintes características:**

a) o tecido ou porção do mesmo é distendido para aumentar o fluxo osmótico transmural;

- b) o tecido é um órgão inteiro, ou uma porção do mesmo;
- c) o tecido é derivado do pré-estômago de um ruminante; e
- d) o tecido é o rúmen.

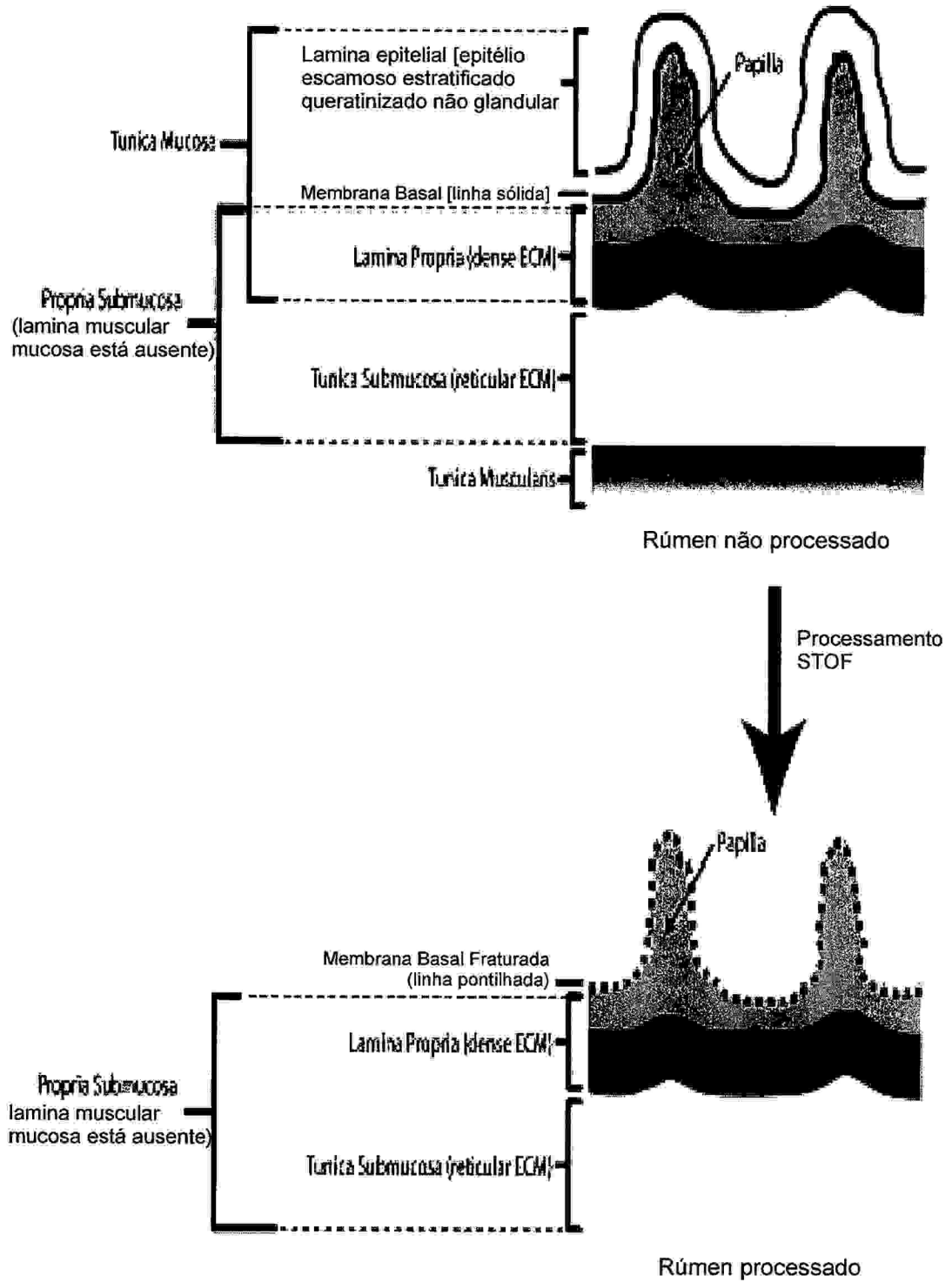
25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado pelo fato de que:**

o ruminante pertence a um gênero selecionado do grupo que consiste em *Capra*, *Bos*, *Cervus* e *Ovis*; ou

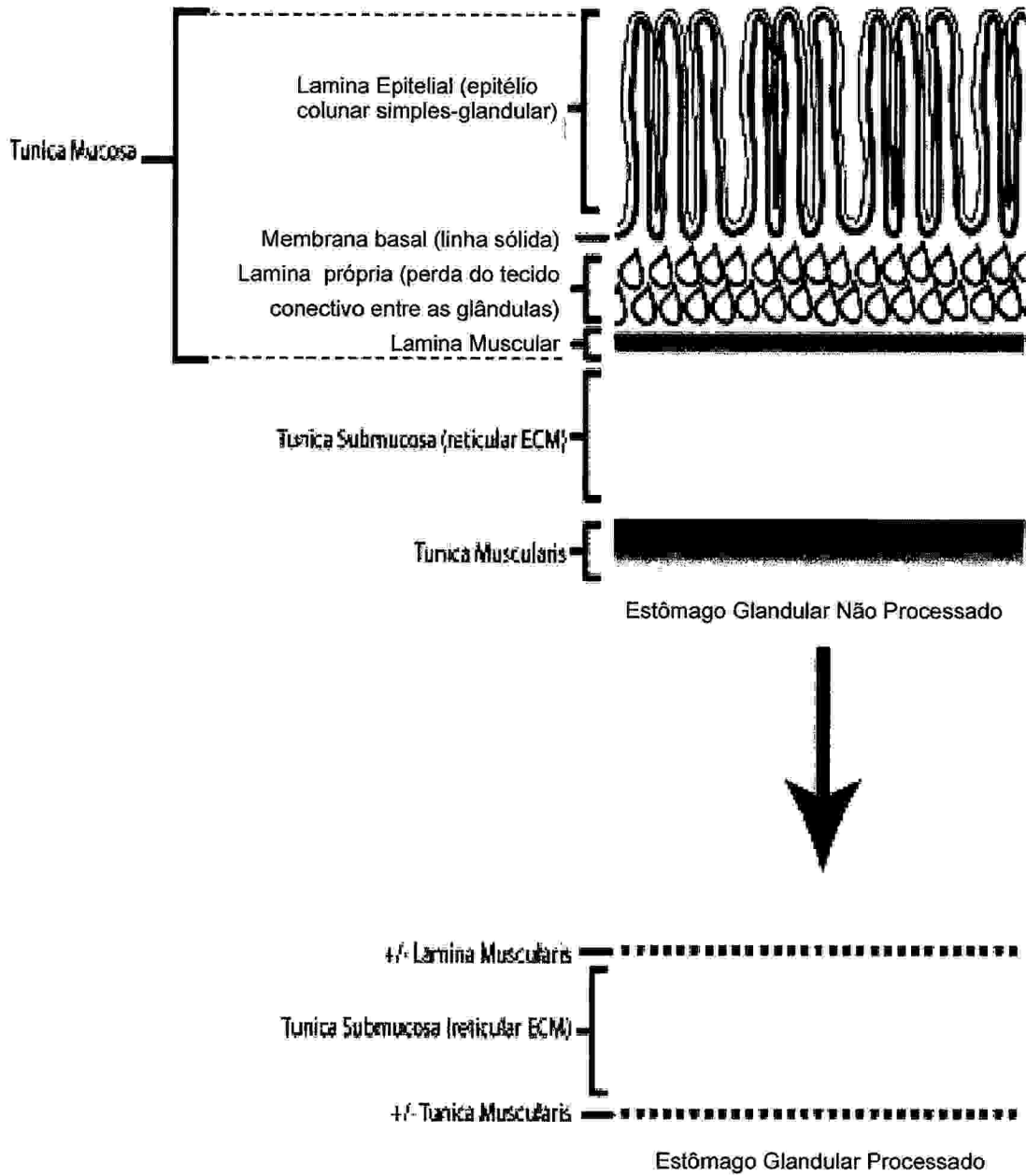
- b) o ruminante é *Ovis aries*.

26. Arcabouço de tecido **caracterizado pelo fato de que** é produzido conforme o método definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 25.

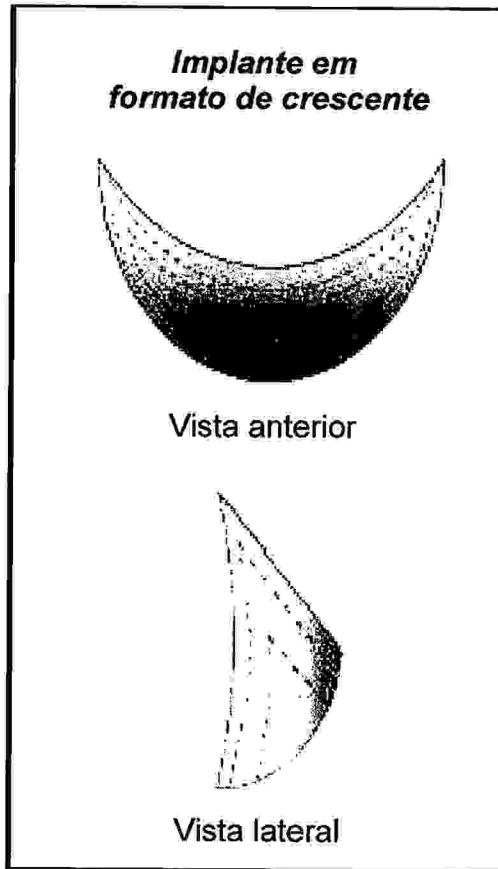
27. Método para formar um arcabouço de tecido **caracterizado pelo fato de que** compreende realizar o método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 25.



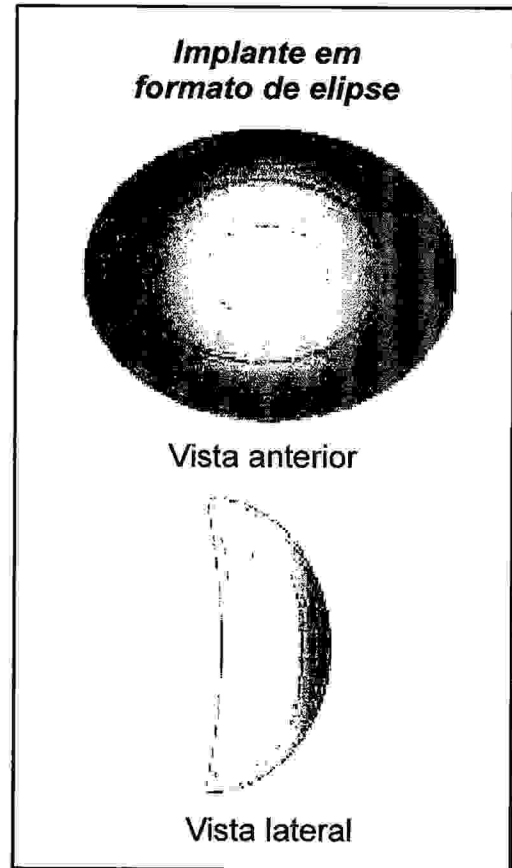
**Fig. 1A**



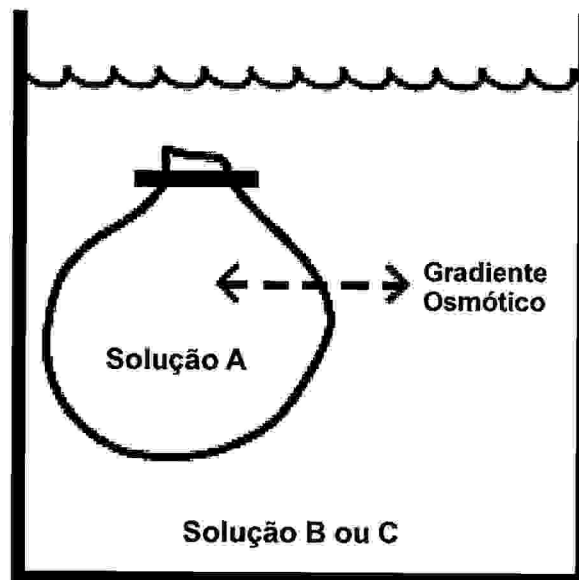
**Fig. 1B**



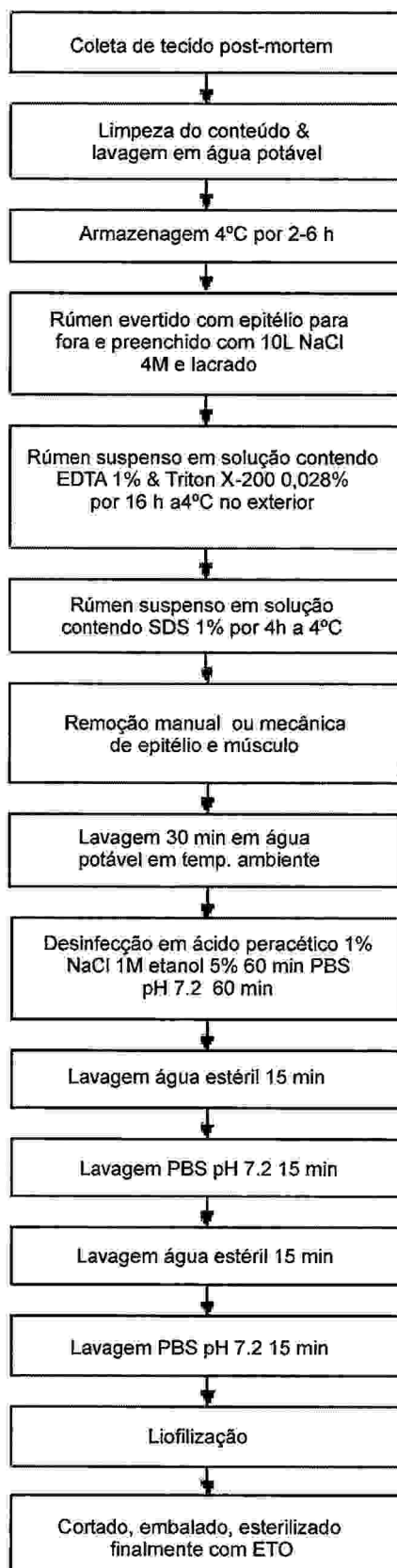
**Fig. 2A**

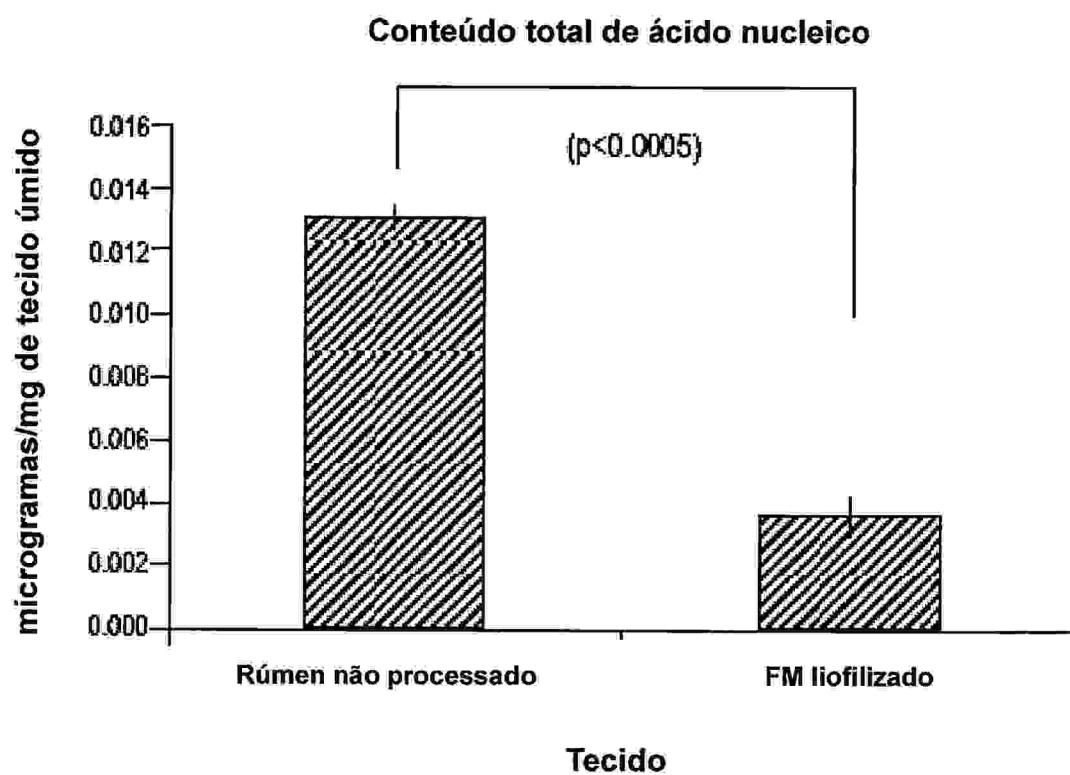


**Fig. 2B**

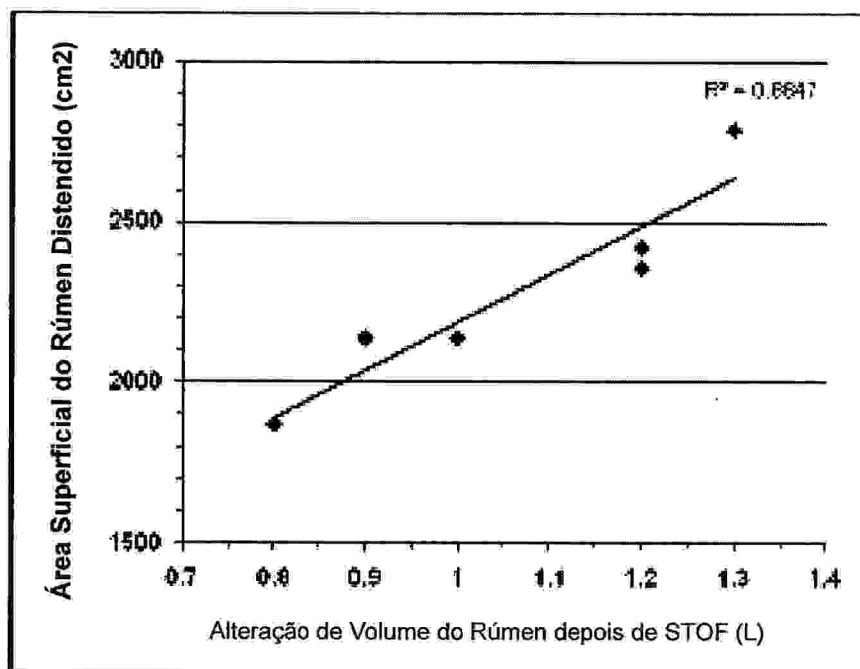


**Fig. 3**

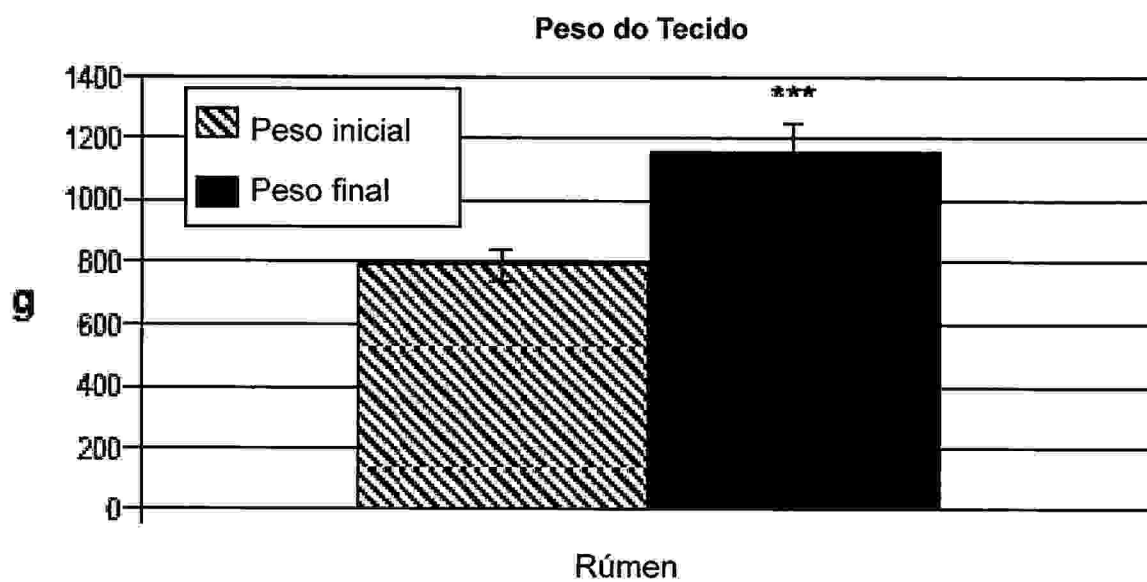
**Fig. 4**



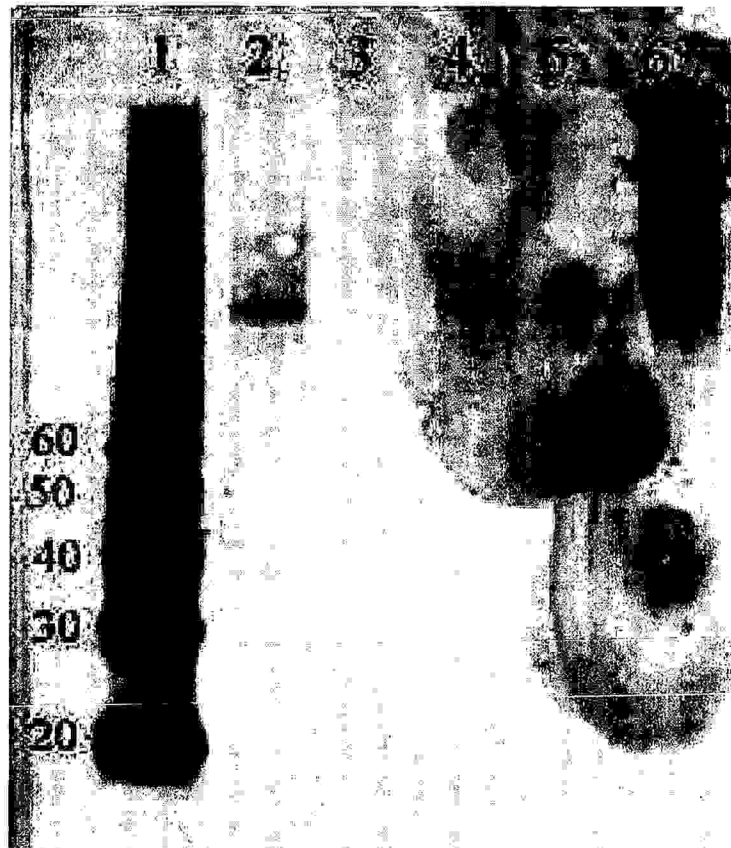
**Fig. 5**



**Fig. 6**

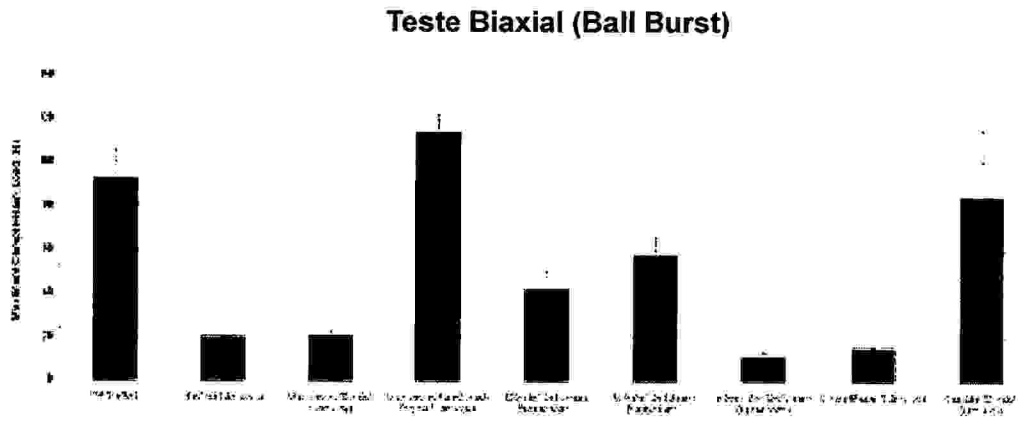


**Fig. 7**

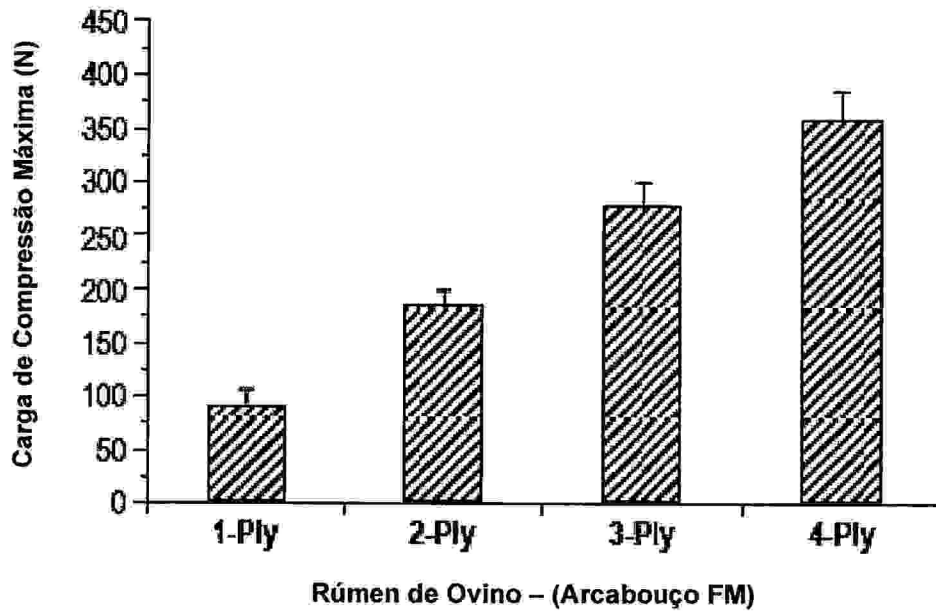


Banda 1: Marcadores Magic (Invitrogen TM)  
Banda 2: Amostra de solução de Triton X-200 0,028% retirada do exterior do rúmen depois da finalização do processo de STOF.  
Banda 3: Amostra de solução de NaCl 4M retirada do interior do rúmen depois da finalização do processo de STOF.  
Banda 4: Amostra de solução de Triton X-200 0,028% + EDTA 0,1% retirada do exterior do rúmen depois da finalização do processo de STOF.  
Banda 5: Amostra de solução de SDS 0,1% retirada do exterior do rúmen depois da finalização do processo de STOF.  
Banda 6: Laminina padronizada

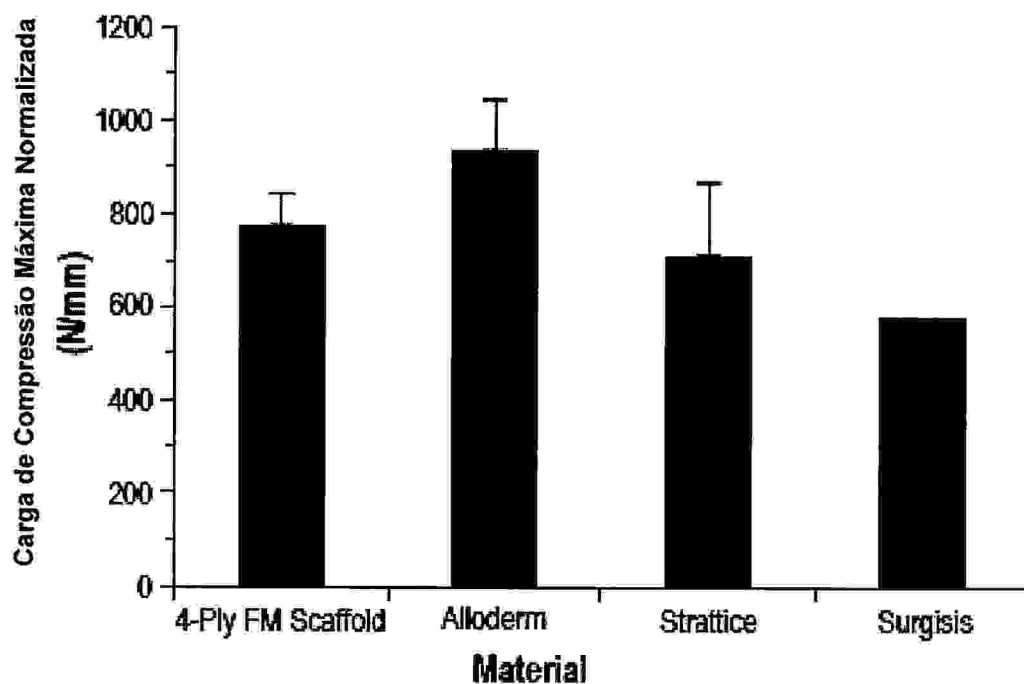
**Fig. 8**



**Fig. 9**

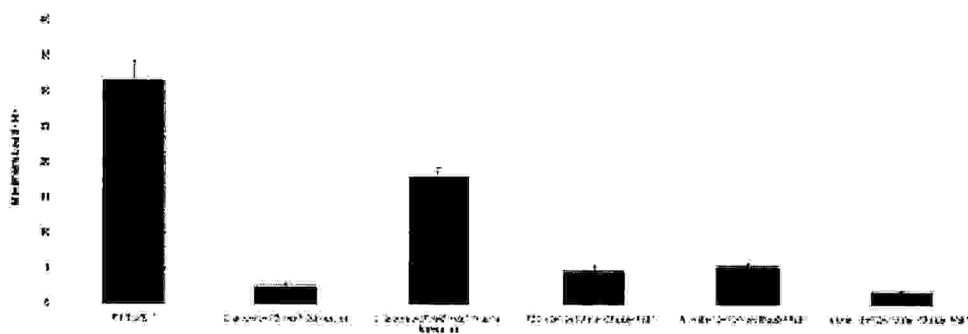


**Fig. 10**



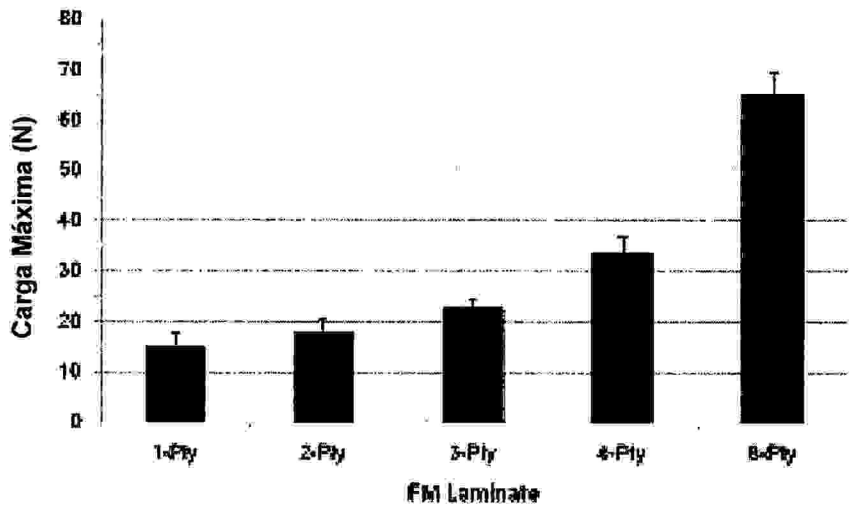
**Fig.11**

**Teste Uniaxial**

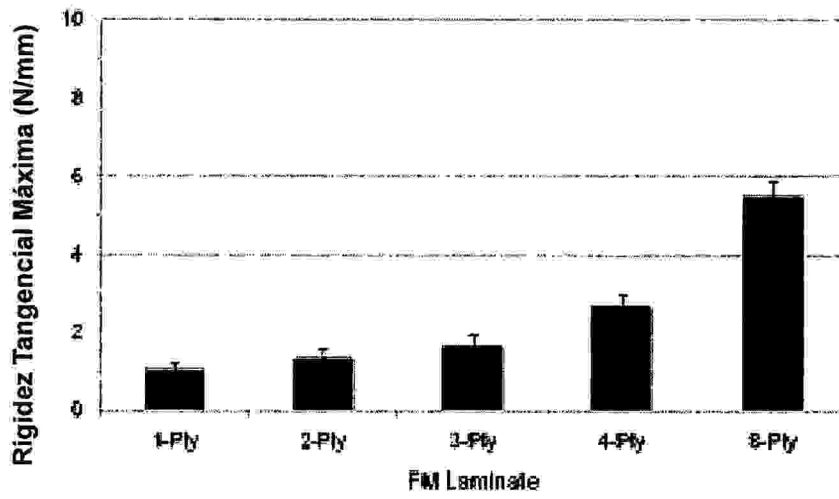


**Fig. 12**

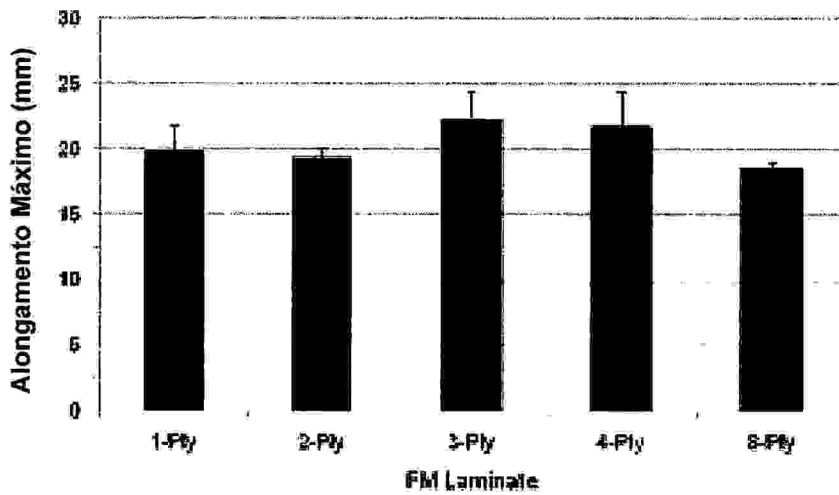
A



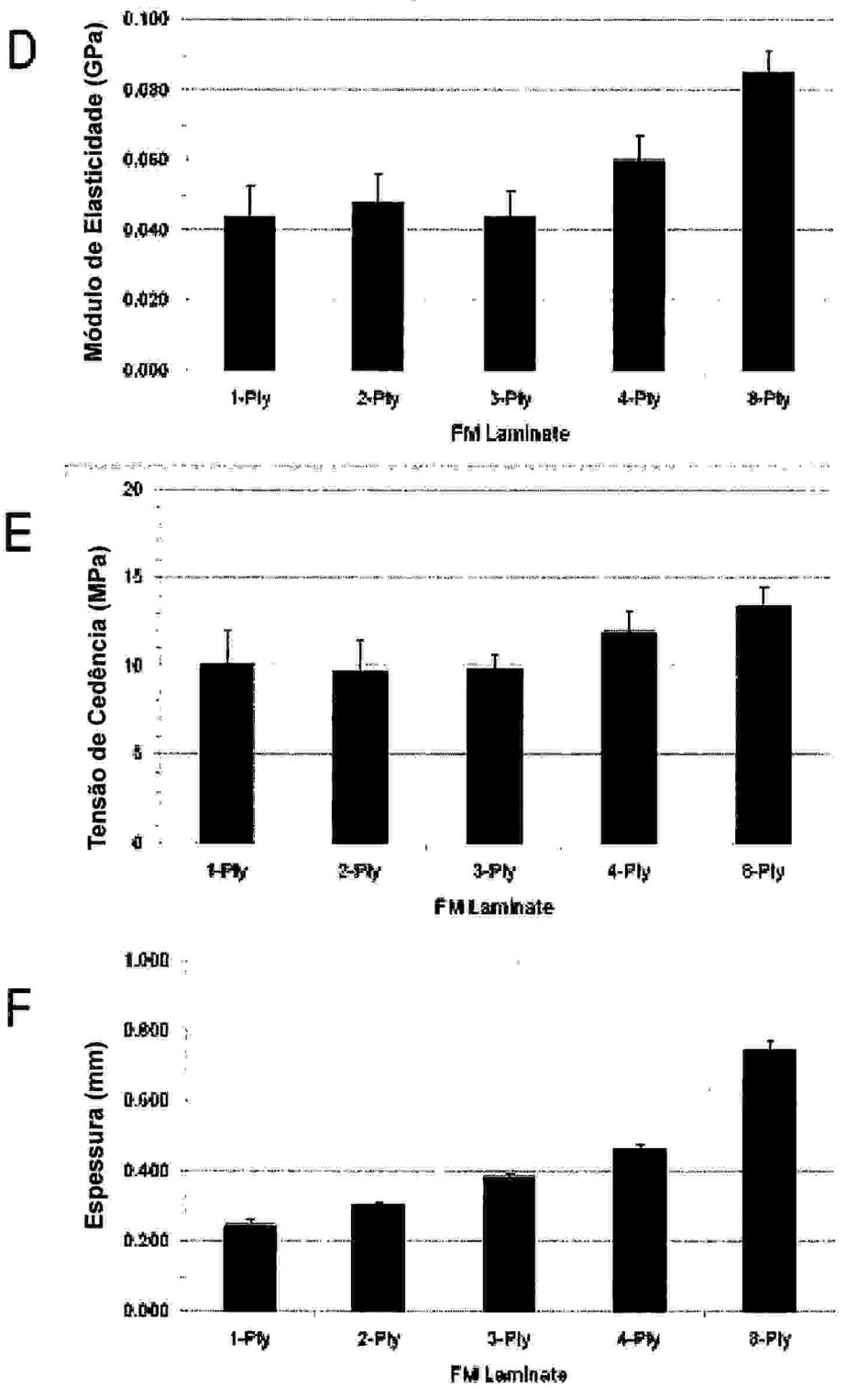
B



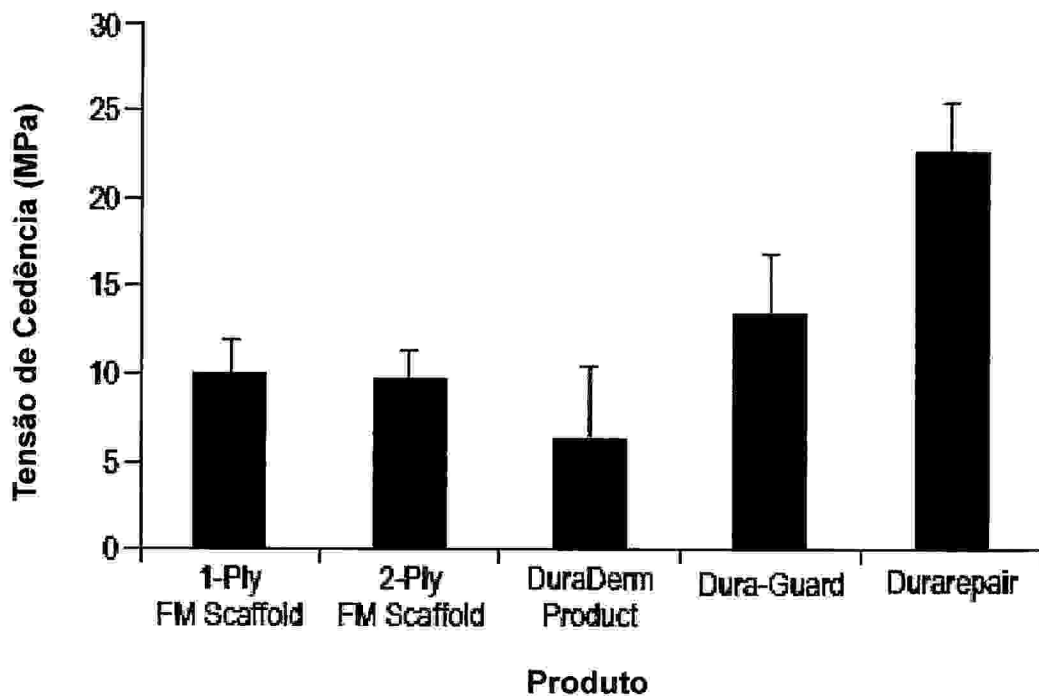
C



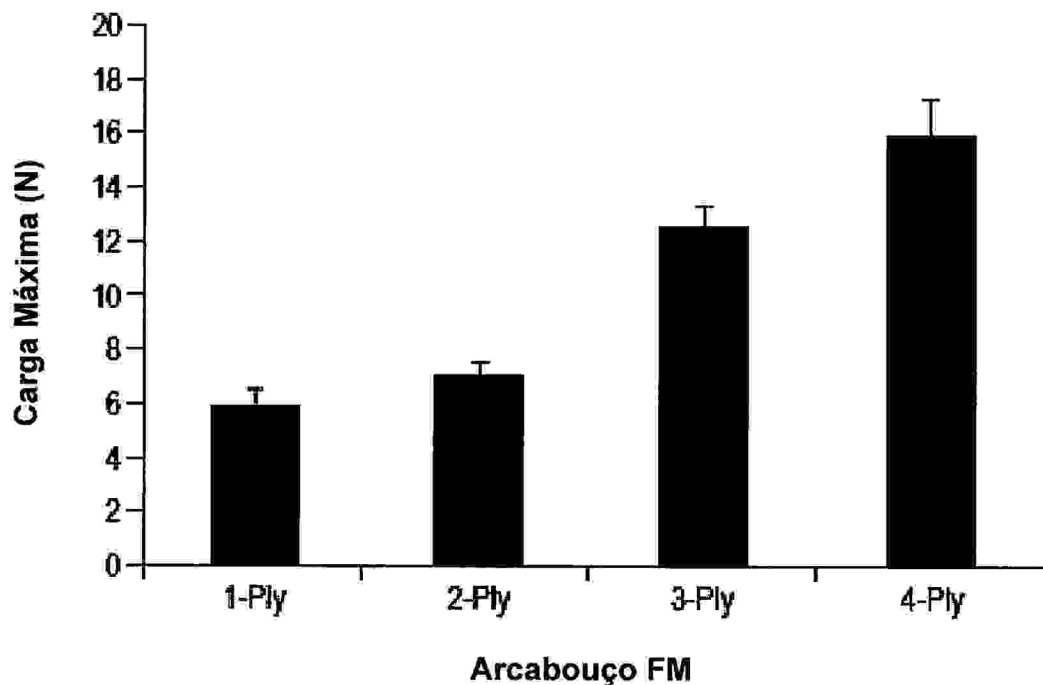
**Fig. 13A-C**



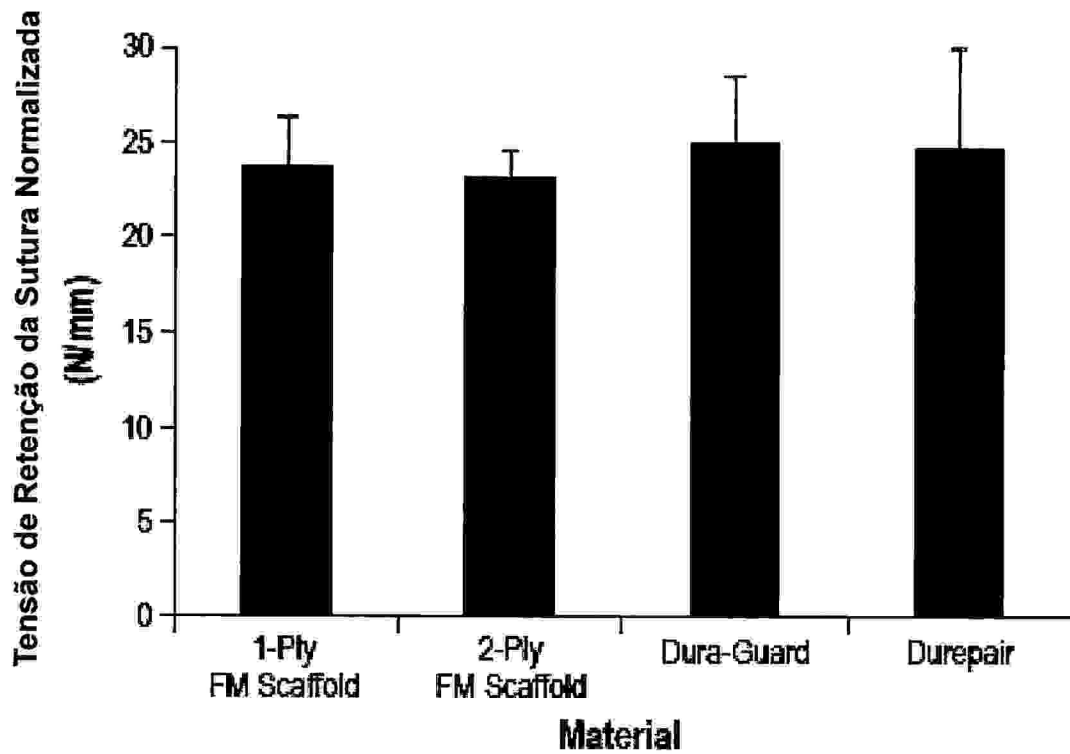
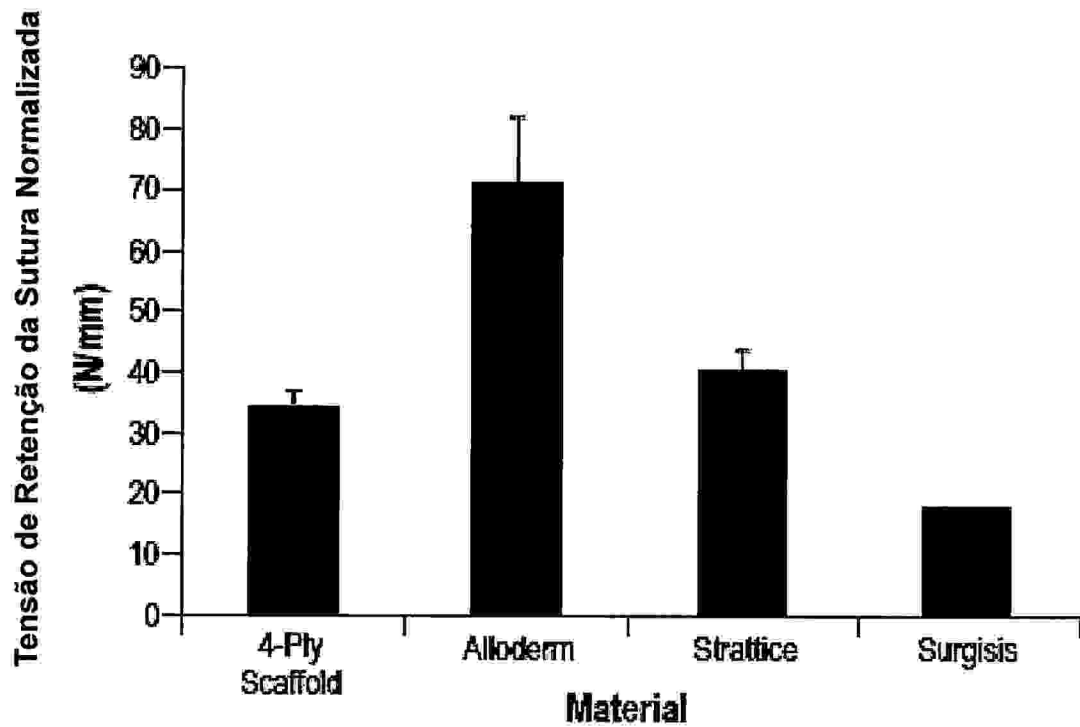
**Fig. 13D-F**



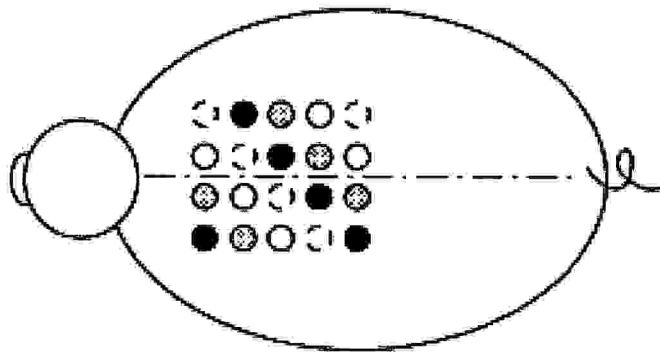
**Fig. 14**



**Fig. 15**

**Fig. 16****Fig. 17**

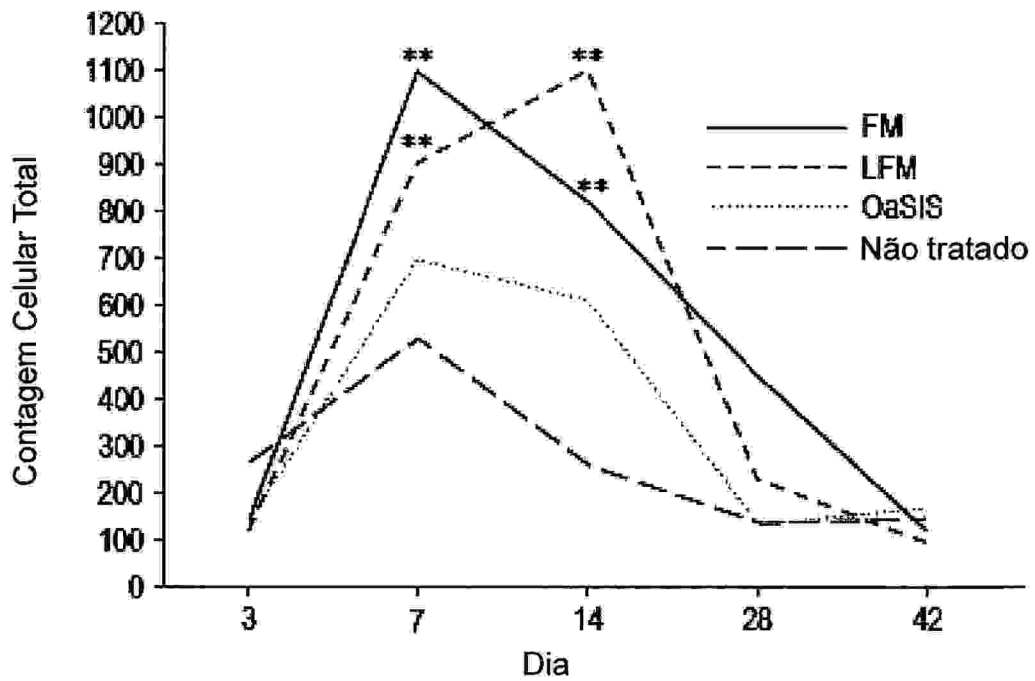
- "1-ply" tratado
- OaSIS tratado
- Não tratado
- "2-ply" tratado



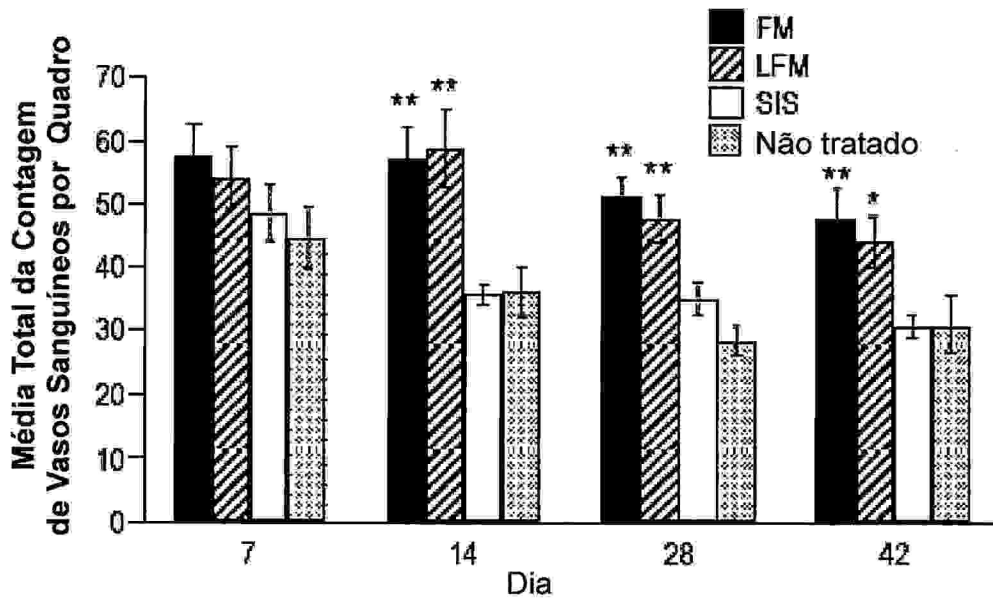
**Fig. 18**

	1-Ply FM					2-Ply FM					SIS				
Fig Number	100	101	102	103	104	100	101	102	103	104	100	101	102	103	104
Dia 3	[Black]														
Dia 7	[Black]														
Dia 14	[Black]														
Dia 28	[White]	[White]	[Black]	[Black]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[Black]	[Black]	[White]	[Black]
Dia 42	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]

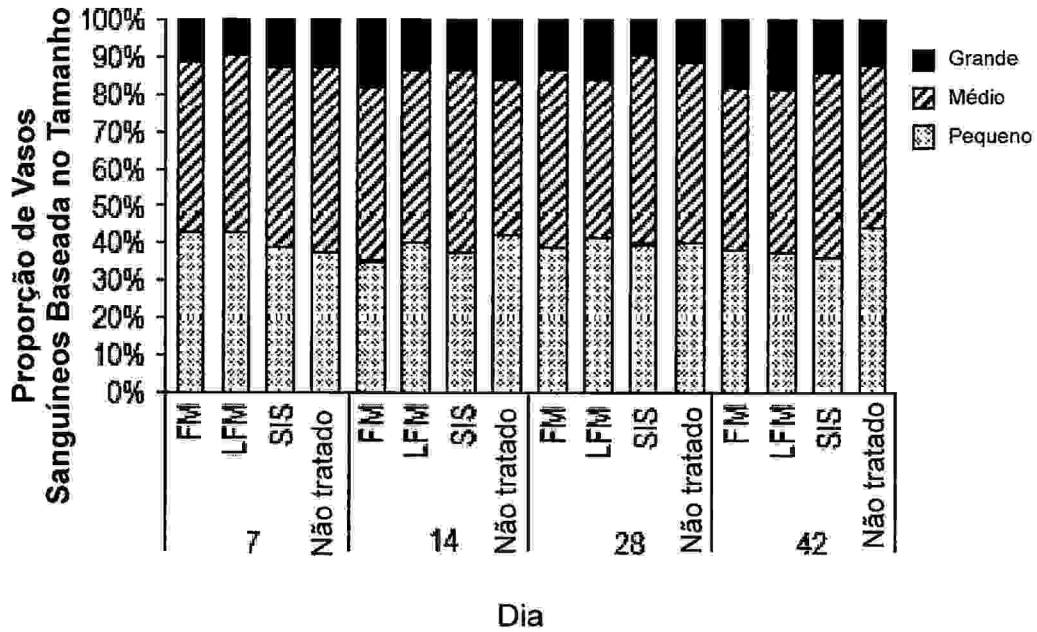
**Fig. 19**



**Fig. 20**



**Fig. 21A**



**Fig. 21B**

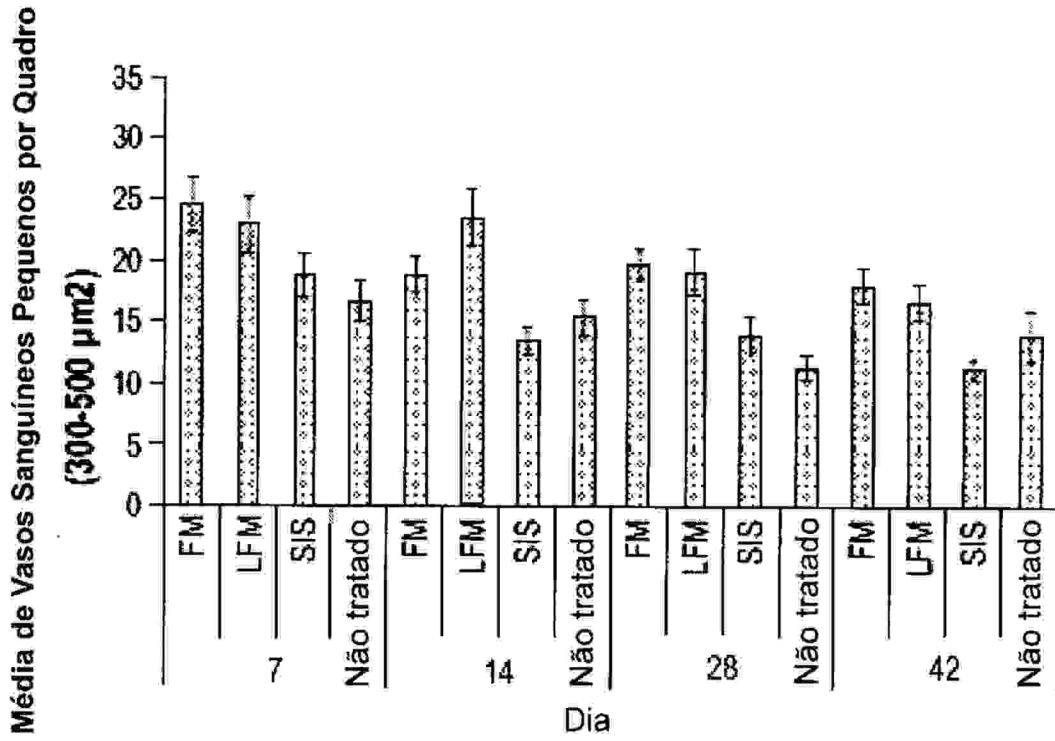


Fig. 21C

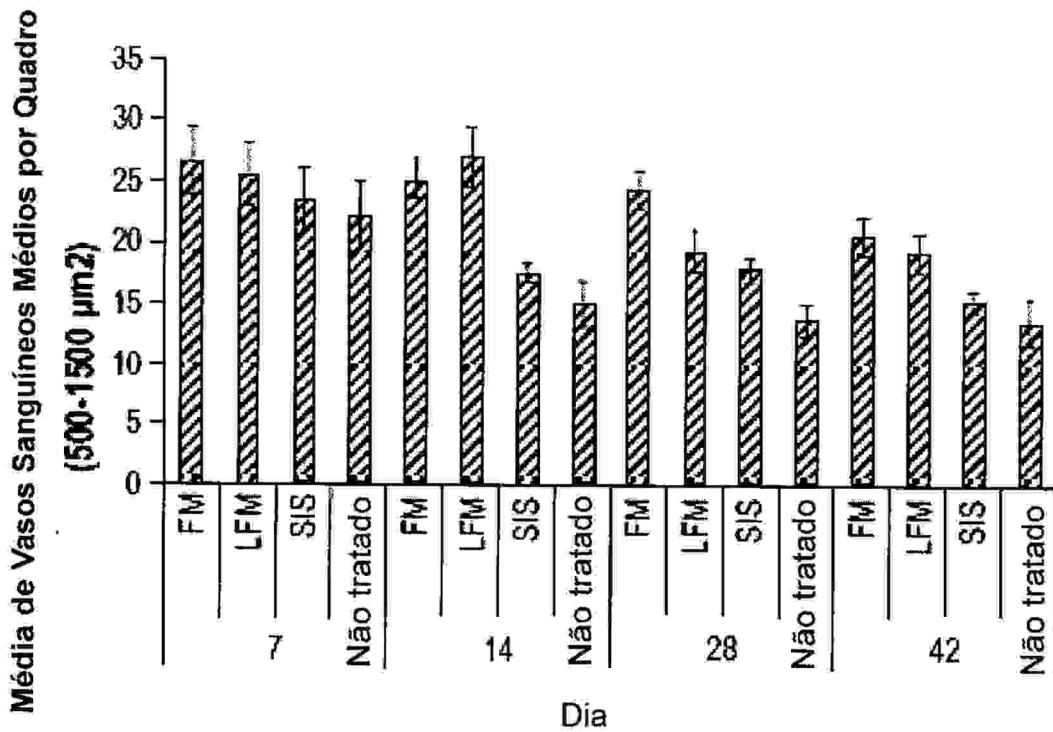
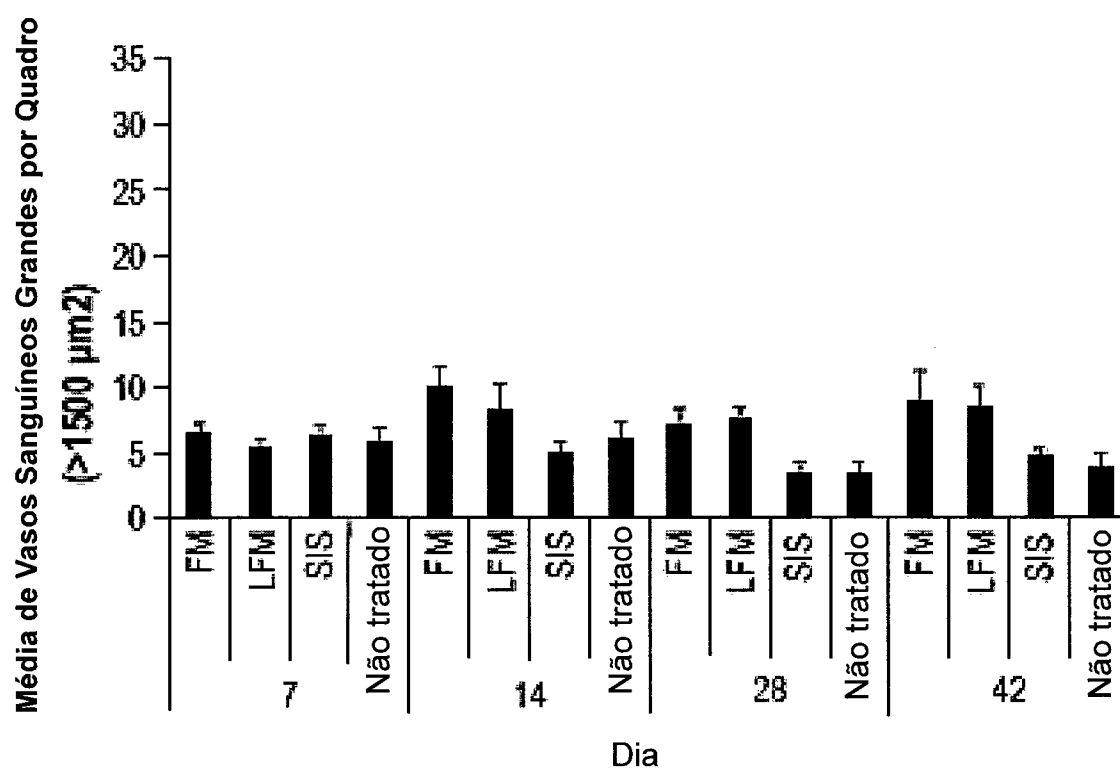


Fig. 21D

**Fig. 21D**

**RESUMO**

Patente de Invenção: **"ARCABOUÇOS DE TECIDO DERIVADO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO PRÉ-ESTÔMAGO"**.

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de arcabouços de Matriz Extracelular (ECM) derivadas do pré-estômago de um ruminante. Tais arcabouços são úteis em várias aplicações clínicas e terapêuticas, incluindo o reparo de lesões, regeneração do tecido e reconstrução da mama. Adicionalmente, a presente invenção apresenta métodos para o isolamento dos arcabouços de ECM de órgãos de mamíferos, incluindo, mas não limitados ao pré-estômago de ruminantes. Tais métodos incluem a geração de um fluxo osmótico transmural entre os dois lados do tecido. A invenção apresenta adicionalmente arcabouços de ECM laminados que contêm um polímero posicionado entre folhas individuais de arcabouços de ECM. O polímero pode conter adicionalmente moléculas bioativas para aperfeiçoar a funcionalidade do arcabouço.