

D04B 1/14 (2013.01) **D06L 1/12** (2013.01)
D01F 4/02 (2013.01) **D03D 15/00** (2013.01)
D02G 3/44 (2013.01) **A61L 27/22** (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01) **D04B 21/16** (2013.01)
D04H 1/42 (2013.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.03.11	(73) Titular(es): ALLERGAN, INC.	
(30) Prioridade(s): 2003.03.11 US 453584	2525 DUPONT DRIVE IRVINE, CA 92612	US
(43) Data de publicação do pedido: 2012.03.07	TUFTS UNIVERSITY	US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.05.22 165/2013	(72) Inventor(es): JINGSONG CHEN GREGORY H ALTMAN REBECCA HORAN DAVID HORAN	US US US US
	(74) Mandatário: CÁTIA CRISTIANA JORGE RIBEIRO LARGO DE SÃO DOMINGOS, 1 2910-092 SETÚBAL	PT

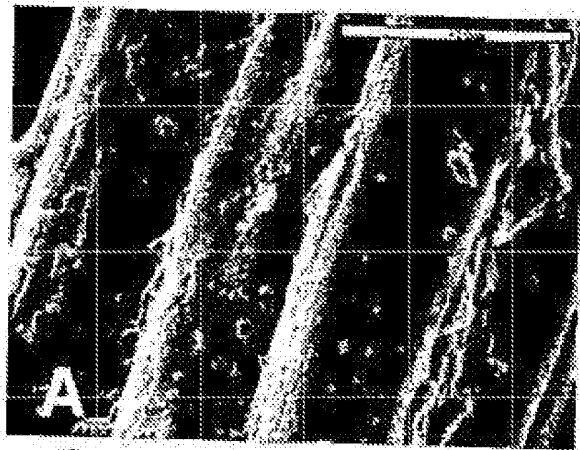
(54) Epígrafe: **DISPOSITIVOS MÉDICOS À BASE DE FIBRAS DE SEDA IMUNONEUTRAS**

(57) Resumo:

A SEDA É PURIFICADA PARA ELIMINAR OS COMPONENTES IMUNOGÉNICOS (PARTICULARMENTE A SERICINA) E É USADA PARA FORMAR DISPOSITIVOS PROSTÉTICOS PARA SUPORTE DE TECIDO PARA IMPLANTAÇÃO.

RESUMO

A seda é purificada para eliminar os componentes imunogénicos (particularmente a sericina) e é usada para formar dispositivos prostéticos para suporte de tecido para implantação.



A

Descrição

DISPOSITIVOS MÉDICOS À BASE DE FIBRAS DE SEDA IMUNONEUTRAS

ANTECEDENTES

As doenças, idade, traumas ou desgaste crónico levam, muitas vezes, à falha de tecidos ou órgãos. No tratamento de tais falhas, o objectivo de muitos procedimentos clínicos é a restauração da função. Um paciente requer, muitas vezes, apoio adicional, além dos próprios meios de cura do corpo, tais como cirurgia ou implante de um dispositivo médico. Tais procedimentos são, muitas vezes, necessários para combater uma deficiência permanente e até mesmo a morte. Os campos dos biomateriais e engenharia de tecido estão a proporcionar novas opções para restaurar, de forma gradual, o tecido nativo e função dos órgãos através de pesquisa e desenvolvimento de suportes, matrizes e construções temporárias (isto é, dispositivos) que apoiam inicialmente um tecido ou órgão deficiente, mas que permitem, eventualmente, o desenvolvimento e remodelação do próprio tecido de função biológica e mecânica do corpo.

As responsabilidades ou requisitos de concepção de tal suporte incluem: (i) a capacidade de providenciar estabilidades mecânicas imediatas ao tecido danificado ou doente, (ii) suporta o crescimento de células e tecido no dispositivo, (iii) comunica o ambiente mecânico do corpo ao tecido em desenvolvimento; tal é alcançado através da concepção mecânica e biológica adequadas do dispositivo, (iv) degrada a uma tal taxa que as células e tecido de crescimento têm tempo suficiente para remodelar, deste modo, criando um novo tecido funcional autólogo que pode sobreviver à vida do paciente. Em certos casos, o dispositivo deve imitar a estrutura tridimensional correcta

(por exemplo, um suporte de osso) do tecido que tenta suportar, em outros casos, o dispositivo pode servir como uma ligadura temporária (por exemplo, uma malha plana para a reparação de uma hérnia ou um hemostato para hemorragia) para um tecido tridimensional (músculo da parede abdominal no caso da hérnia). Independentemente da aplicação, a presente direcção do campo do dispositivo médico é a restauração completa da função corporal através do suporte do desenvolvimento do tecido autólogo.

Infelizmente, a maior parte dos biomateriais disponíveis hoje em dia não possui a integridade mecânica de aplicações com necessidade de alta carga (por ex., ossos, ligamentos, tendões, músculo) ou a funcionalidade biológica adequada; a maior parte dos biomateriais ou se desgastam muito rapidamente (por ex., colagénio, PLA, PGA, ou copolímeros relacionados) ou são não-degradáveis (por ex., poliésteres, metal), onde em cada caso, o tecido autólogo funcional não se desenvolve e o paciente sofre a incapacidade. Em certos casos, um biomaterial pode orientar de forma errada a diferenciação e desenvolvimento do tecido (por ex., formação espontânea do osso, tumores) porque lhe falta biocompatibilidade com as células e tecido circundantes. Também, um biomaterial que não se degrada normalmente é associado à inflamação crónica, onde tal resposta é, na realidade, prejudicial (isto é, enfraquece) para o tecido circundante.

Se concebida adequadamente, a seda pode oferecer novas opções clínicas para a concepção de uma nova classe de dispositivos médicos, suportes e matrizes. A seda tem mostrado possuir a maior força de todas as fibras naturais, e rivaliza com as propriedades mecânicas de fibras sintéticas de alto desempenho. As sedas são também estáveis

a altas temperaturas fisiológicas e num amplo intervalo de pH, e são insolúveis nos solventes mais aquosos e orgânicos. A seda é uma proteína, em vez de um polímero sintético, e produtos de degradação (por ex., péptidos, aminoácidos) são biocompatíveis. A seda não deriva de animais e transporta bem menos biocarga que outros biomateriais naturais comparáveis (por ex., colagénio proveniente de bovinos ou suínos).

Seda, termo como é normalmente conhecido na técnica, significa um produto com fibras filamentosas segregadas por um organismo, tal como um bicho-da-seda ou aranha. As sedas produzidas por insectos, nomeadamente (i) bichos-da-seda *Bombyx mori*, e (ii) as glândulas das aranhas, normalmente *Nephila clavipes*, são as formas mais frequentemente estudadas do material; contudo, existem centenas a milhares de variantes naturais de seda na natureza. A fibroína é produzida e segregada por duas glândulas de seda do bicho-da-seda. À medida que a fibroína deixa as glândulas, esta é revestida com sericina, uma substância tipo cola. Contudo, a seda proveniente da aranha é valorizada (e diferenciada da seda do bicho-da-seda) uma vez que é produzida como um único filamento, faltando quaisquer contaminantes imunogénicos, tal como a sericina.

Infelizmente, a seda proveniente da aranha não pode ser produzida em massa devido à incapacidade de domesticar aranhas; contudo, a seda proveniente de aranha, bem como as outras sedas, pode ser clonada e produzida recombinantemente, mas com resultados que variam extremamente.

Frequentemente, estes processos introduzem biocargas, são dispendiosos, não conseguem produzir material em quantidades

significativas, resultam em propriedades de material altamente variável, e não são demasiado controlados ou reproduzíveis.

Como resultado, apenas o bicho-da-seda foi usado em aplicações médicas há mais de 1000 anos. A espécie *Bombyx mori* de bicho-da-seda produz uma fibra de seda (conhecida como um "fio") e usa a fibra para construir o seu casulo. O fio, como produzido, inclui dois filamentos de fibroína ou "*broins*", que são rodeados com um revestimento de goma, conhecida como sericina— o filamento de fibroína de seda possui uma integridade mecânica significativa. Quando as fibras de seda são colhidas para produzir fios ou têxteis, incluindo suturas, uma pluralidade de fibras pode ser alinhada em conjunto, e a sericina é parcialmente dissolvida e depois novamente solidificada para criar uma estrutura de fibra de seda maior com mais do que dois *broins*, mutuamente embebidos num revestimento de sericina.

Como aqui usado, a "fibroína" inclui fibroína de bicho-da-seda (isto é, de *Bombyx mori*) e fibras tipo fibroína provenientes de aranhas (isto é, de *Nephila clavipes*). Alternativamente, a proteína de seda adequada ao uso na presente invenção pode ser obtida a partir de uma solução que contém uma seda geneticamente produzida, tal como a partir de uma bactéria, levedura, células mamíferas, animais transgênicos ou plantas transgênicas. Ver, por exemplo, WO 97/08315 e patente americana N°. 5,245,012.

As fibras de seda provenientes do bicho-da-seda, tradicionalmente disponíveis no mercado comercial para aplicações de suturas e têxteis, são habitualmente "degomadas" e consistem de múltiplos *broins* dobrados em conjunto para formar uma fibra única multifilamento. A

degomagem refere-se aqui ao afrouxamento do revestimento de sericina em redor dos dois *broins* através da lavagem ou extracção em água quente com sabão. Tal afrouxamento permite a dobragem de *broins* para criar fibras únicas multifilamento. Contudo, a extracção completa não é, muitas vezes, atingida nem desejada. A seda degomada contém habitualmente, ou é revestida com sericina e/ou as impurezas de sericina são introduzidas durante a dobragem, de modo a solidificar a fibra única multifilamento. O revestimento de sericina protege os filamentos de fibroína frágeis (apenas ~5 microns de diâmetro) para que não se desfiem durante as aplicações têxteis tradicionais onde é necessário um processamento de alto rendimento. Deste modo, a seda degomada, excepto se explicitamente declarada como livre de sericina, contém normalmente 10-26% (por peso) de sericina (ver Tabelas 1 e 2).

Quando se refere, normalmente, a "seda" na literatura, é inferido que as informações são focadas na "seda" de ocorrência natural e apenas disponível (isto é, fibras de fibroína revestidas com sericina) que têm sido usadas durante séculos em têxteis e medicina. A seda do bicho-da-seda de utilização médica é tradicionalmente usada em apenas duas formas: (i) como sutura de seda virgem, onde a sericina não foi removida, e (ii) a sutura de seda tradicional mais popular, ou comumente referida como sutura de seda entrelaçada negra, onde a sericina foi completamente removida, mas substituída com um revestimento de cera ou silicone para providenciar uma barreira entre a fibroína de seda e o tecido e células do corpo. Actualmente, a aplicação apenas médica, para a qual a seda é ainda usada, está na ligação da sutura, particularmente porque a seda ainda é valorizada pelas suas propriedades mecânicas na cirurgia (por ex., resistência do nó e maneabilidade).

Apesar do uso de seda virgem como um material de sutura durante milhares de anos, a chegada de novos biomateriais (colagénio, sintéticos) permitiu comparações entre materiais e identificou problemas com sericina. A seda, ou mais claramente definida como seda do bicho-da-seda *Bombyx mori*, não é biocompatível. A sericina é antigénica e obtém uma resposta substancial imune, alérgica ou hiper-resposta da célula T (versus a resposta de "corpo estranho" suave normal). A sericina pode ser removida (lavada/extraída) da fibroína da seda; contudo, a remoção de sericina da seda altera a ultra-estrutura das fibras de fibroína, expondo-as, e resulta na perda da resistência mecânica, levando a uma estrutura frágil.

As estruturas de seda extraída (isto é, fios, matrizes) são especialmente susceptíveis de desfiar e a falhas mecânicas durante os procedimentos têxteis padrão devido à natureza multifilamento de filamentos de fibroína de diâmetro mais pequeno (~5 µm). A fragilidade da fibroína extraída é a razão pela qual que quando se usa seda na concepção e desenvolvimento de dispositivos médicos, após a extracção, é normalmente ensinado (Perez-Rigueiro, J. Appl. Polymer Science, 70,2439-2447,1998) que deve dissolver e reconstituir a seda usando métodos padrão (patente americana N°. 5,252,285) para obter um biomaterial passível de ser trabalhado. A incapacidade para lidar com a fibroína de seda extraída com os métodos têxteis e maquinaria actuais evitou o uso de fibroína sem sericina não dissolvida de ser utilizada como um dispositivo médico.

As limitações adicionais de fibroína de seda, quer extraída da seda de bicho-da-seda, dissolvida e reconstituída ou produzida por aranhas ou insectos que não os bichos-da-seda, incluem (i) a natureza hidrofóbica da seda, um resultado

directo da conformação do cristal folha-beta da proteína de fibroína central que confere à seda a sua resistência, (ii) a falta de domínios de ligação de células normalmente encontradas nas proteínas de matriz extracelular mamíferas (por ex., a sequência peptídica RGD), e (iii) superfície suave da fibroína de seda. Como resultado, as células (por ex., macrófagos, neutrófilos), associadas a uma resposta de tecido inflamado e anfitrião, não são capazes de reconhecer a fibroína de seda como um material capaz de degradação. Essas células optam desta forma por encapsular e impedir o corpo estranho (ver Fig. 18A) limitando deste modo (i) a degradação da fibroína de seda, (ii) o crescimento do tecido, e (iii) a remodelação do tecido. Deste modo, os filamentos de fibroína de seda induzem frequentemente uma forte resposta ao corpo estranho (FBR) que é associada a uma inflamação crónica, um granuloma periférico e encapsulamento de cicatrizes (Fig. 18A).

Adicionalmente às desvantagens biológicas da seda, a natureza da seda multifilamento (por ex., as suturas), assim como a pequena dimensão dos filamentos de fibroína, pode originar uma estrutura bem unida. Assim, a seda pode degradar muito rapidamente. As proteases (enzimas) produzidas das células estimuladas, encontradas no encapsulamento periférico, podem penetrar na estrutura implantada (ver Fig. 11A e Fig. 11B), mas as células que depositam novos tecidos (por ex., fibroblastos), que podem reforçar o dispositivo (neste caso, uma sutura entrelaçada negra) durante a remodelação de tecido normal, não podem. Por conseguinte, o interior de dispositivos de fibroína não tratada ou não modificada não entra em contacto com a resposta e tecido do corpo estranho anfitrião (liderado e produzido por fibroblastos) e como resultado, a capacidade do dispositivo para levar à remodelação do tecido é

limitada. O crescimento do tecido e célula anfitriã é limitado e a degradação não é normalmente possível.

No caso de suturas, é pensado que esses problemas podem ser resolvidos ao tratar as suturas de fibroína com os agentes de ligação ou ao revestir as suturas com cera, silicone ou polímeros sintéticos, protegendo, deste modo, o material do corpo. Os revestimentos, tais como sericina, cera ou silicone, criados para adicionar estabilidade mecânica à fibroína (combatendo a sua fragilidade enquanto providencia uma barreira entre o corpo e a fibroína), limitam a ligação de células, reconhecimento, infiltração e crescimento de tecido e degradação de fibroína. Como resultado, a seda é tradicionalmente considerada como um material não degradável.

A classificação como não degradável pode ser desejável quando a seda se destina ao uso como um dispositivo de ligação de sutura tradicional, isto é, o crescimento de tecido e célula no dispositivo não é desejável. Por conseguinte, a ligação e crescimento de célula (que leva à degradação de matriz e remodelação de tecido activa) são tradicionalmente evitados pela natureza biológica da seda e o *design* mecânico da estrutura. De facto, uma consideração geral de que a seda deve ser protegida do sistema imunológico e a percepção de que a seda não é biodegradável, limitaram o uso da seda na cirurgia. Mesmo no campo das suturas, a seda foi substituída na maioria das aplicações por materiais sintéticos, quer biodegradáveis ou permanentes.

Por conseguinte, existe uma necessidade para que os implantes de tecido com fibras de fibroína de bichos-da-seda, de onde foi extraída a sericina, sejam biocompatíveis,

promovam o crescimento de células e sejam biodegradáveis.

RESUMO

As construções de fibras de fibroína de seda natural aqui descritas oferecem uma combinação de alta resistência, resistência prolongada à fadiga e rigidez e alongamento em propriedades de ruptura que correspondem rigorosamente àsquelas dos tecidos biológicos. As fibras na construção são alinhadas de forma não aleatória num ou mais fios. As construções de fibra são biocompatíveis (devido à extracção de sericina das fibras de seda de bicho-da-seda) e substancialmente livres de sericina. As construções de fibra são ainda não imunogénicas; isto é, não provocam uma resposta substancial alérgica, antigénica ou de uma hiper-resposta da célula T por parte do anfitrião, diminuindo o efeito nocivo nos tecidos biológicos circundantes, tais como aqueles que podem acompanhar as respostas do sistema imunitário em outros contextos. Adicionalmente, as construções de fibra promovem o crescimento de células em redor das ditas fibras de fibroína e são biodegradáveis.

As indicações de que a construção de fibra é "substancialmente livre" de sericina significam que a construção de fibra compreende menos de 20% de sericina por peso. Preferivelmente, a construção de fibra compreende menos de 10% de sericina por peso. Mais preferivelmente, a construção de fibra compreende menos de 1% de sericina por peso (ver Tabela 2). Além disso, "substancialmente livre" de sericina pode ser funcionalmente definido como um conteúdo de sericina que não provoca uma resposta substancial alérgica, antigénica ou hiper-resposta de células T por parte do anfitrião. Do mesmo modo, a indicação de que existe menos de 3% de alteração na massa, após uma segunda

extracção, vai implicar que a primeira extracção "remova substancialmente" a sericina da construção e que a construção resultante ficou "substancialmente livre" de sericina após a primeira extracção (ver Tabela 2 e Fig. 1F).

Os métodos desta descrição extraem sericina da construção muito mais cuidadosamente do que os procedimentos de "degomagem" normais que caracterizam as práticas de processamento tradicional para a produção de têxteis de seda para aplicações não cirúrgicas (ver acima para definição). A Figura 1A mostra uma imagem de uma fibra degomada onde os filamentos de fibroína foram torcidos em conjunto formando uma fibra maior revestida com sericina. Esta fibra "degomada" contém ~26%, por peso, de sericina. Numa forma de realização preferida, as fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina retêm a sua estrutura de proteína nativa e não foram dissolvidas e reconstituídas.

As fibras de fibroína de seda "natural" são produzidas por um insecto, tal como um bicho-da-seda ou uma aranha, e possuem a sua estrutura de proteína nativa, como formada. Preferivelmente, as construções de fibra de fibroína de seda não são recombinantes (isto é, não são geneticamente criadas) e não foram dissolvidas e reconstituídas. Numa forma de realização preferida, as fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina compreenderam fibras de fibroína obtidas do bicho-da-seda *Bombyx mori*. Adicionalmente, o termo "biodegradável" é aqui usado para significar que as fibras são degradadas no espaço de um ano quando em contacto contínuo com um tecido corporal. Adicionalmente, os nossos dados sugerem (Fig. 13 A-E, Fig. 18 A-C e Fig. 19 A-D) que a taxa de degradação pode ser influenciada e melhorada por modificação da superfície da

fibroína (Fig. 13 A-D e Fig. 18 A-C), assim como a configuração geométrica do fio e/ou tecido (Fig. 19 A-D). Numa forma de realização, o fio de fibroína de seda perde 50% da sua resistência à tracção no espaço de duas semanas após a implantação *in vivo* (Fig. 12) e 50% da sua massa em aproximadamente 30 a 90 dias *in vivo*, dependendo do local de implantação (Fig. 13 A-D). A escolha do local de implantação *in vivo* (por ex., intramuscular versus subcutâneo) mostrou influenciar significativamente a taxa de degradação (Fig. 13 A-D).

A "seda para têxteis" é uma seda que ocorre naturalmente, que inclui um revestimento de sericina superior a 19%-28% por peso da fibra. A "seda de sutura" é seda que contém sericina ("sutura de seda virgem") ou é revestida com uma composição hidrofóbica, tal como cera de abelha, cera de parafina, silicone ou um revestimento polimérico sintético ("sutura de seda entrelaçada negra"). A composição hidrofóbica repele as células ou inibe as células de se anexarem à fibra revestida. A seda entrelaçada negra é uma seda de sutura na qual a sericina foi extraída e substituída com revestimento adicional. A seda de sutura normalmente não é biodegradável.

Devido à ausência de uma cera protectora ou outro revestimento hidrofóbico nas fibras, as construções de fibroína de seda descritas são biologicamente (união de domínios de ligação de células) e/ou mecanicamente (aumento da área da superfície da seda e diminuição da densidade de embalagem) criadas para promover infiltração de célula aumentada comparada com a seda para têxteis ou seda de sutura quando implantada em tecido humano. Como resultado, as construções de fibroína de seda suportam o crescimento/infiltração da célula e união e difusão da

célula melhorada, o que leva à degradação das construções de fibroína de seda, criando deste modo, essencialmente, um novo biomaterial biodegradável para utilização num dispositivo médico e aplicações de engenharia de tecido. A capacidade da construção da fibra em suportar a união da célula e crescimento/infiltração da célula e tecido na construção, que por sua vez apoia a degradação, pode ser ainda melhorada através da modificação da superfície da fibroína (união de péptidos usando RGD, modificação de espécies químicas e aumentando a hidrofiliicidade através do tratamento de plasma de gás) e/ou o *design* mecânico da construção, aumentando deste modo a área da superfície do material, aumentando assim a sua susceptibilidade para aquelas células e enzimas que possuem a capacidade de degradar a seda. As fibras de seda são opcionalmente revestidas com uma composição hidrofílica, por ex., colagénio ou uma composição peptídica, ou mecanicamente combinada com um biomaterial que suporta o crescimento da célula e tecido para formar uma estrutura de composto. A escolha de biomaterial, quantidade e interacção mecânica (por ex., enrolado ou entrelaçado sobre um núcleo de fibroína de seda) pode ser usada para alterar e/ou melhorar as taxas do crescimento da célula e degradação da construção.

As fibras na construção são alinhadas de forma não aleatória umas com as outras, num ou mais fios. Tal estrutura pode ser em paralelo, entrelaçada, texturizada, organizada helicoidalmente (torcida, cablada (por ex., um cabo)) disposta para formar um fio. Um fio pode ser definido como consistindo, pelo menos, de uma fibra de fibroína. Preferivelmente, um fio consiste de, pelo menos, três fibras de fibroína alinhadas. Um fio é um conjunto de fibras torcidas ou, de outro modo, mantidas em conjunto num

filamento contínuo. Um número quase infinito de fios pode ser gerado através de vários meios de produção e combinação de fibras. Uma fibra de seda é acima descrita; contudo, o termo fibra é um termo genérico que indica que a estrutura tem um comprimento 100 vezes superior ao seu diâmetro.

Quando as fibras são torcidas ou, de outro modo, entrelaçadas para formar um fio, estas são torcidas/entrelaçadas o suficiente para prender essencialmente nas posições de fibra relativa e remover a folga, mas não tanto de forma a deformar plasticamente as fibras (isto é, não excede o limite de elasticidade do material), o que compromete a sua fadiga (isto é, reduz o número de ciclos de tensão antes da falha). As construções de fibra de fibroína sem sericina podem ter uma resistência à tracção seca (UTS) de, pelo menos, 0,52 N/fibra (Tabela 1,4), e uma rigidez entre cerca de 0,27 e cerca de 0,5 N/mm por fibra. Dependendo da organização e hierarquia da fibra, mostrámos que a UTS da construção de fibroína pode variar desde 0,52 N/fibra até cerca de 0,9 N/fibra. As construções de fibroína aqui descritas retêm cerca de 80% da sua UTS seca e cerca de 38% da sua rigidez seca, quando testada húmida (Tabela 5). Os alongamentos em falha entre cerca de 10% e cerca de 50% foram normalmente para a construção de fibroína testada nos estados seco e húmido. A construção de fibroína produzida, normalmente a cerca de 40 a 50% das suas UTS e com uma resistência à fadiga de, pelo menos, 1 milhão de ciclos numa carga de cerca de 20% da resistência à tracção dos fios.

Numa forma de realização da presente invenção, as fibras de fibroína do bicho-da-seda de onde foi extraída a sericina são torcidas umas em relação às outras entre 0 a 11,8 torções por cm (ver Tabela 6 e 7).

O número de hierarquias na estrutura geométrica da construção da fibra, assim como o número de fibras/grupos/conjuntos/fios/cordas dentro de um nível hierárquico, a forma de entrelaçamento a níveis diferentes, o número de níveis e o número de fibras em cada nível podem todos ser variados para alterar as propriedades mecânicas da construção da fibra (isto é, fio) e por conseguinte, do tecido (Tabela 4 e 8). Numa forma de realização da presente invenção, a construção da fibra (isto é, fio) é organizada numa organização hierárquica de nível único, a dita organização hierárquica de nível único que compreende um grupo de fios paralelos ou entrelaçados. Alternativamente, a construção da fibra (isto é, fio) organizada na organização hierárquica de dois níveis, a dita organização hierárquica de dois níveis compreende um conjunto de grupos entrelaçados. Noutra forma de realização da presente invenção, a construção da fibra (isto é, fio) é organizada numa organização hierárquica de três níveis, a dita organização hierárquica de três níveis compreendendo um filamento de conjuntos entrelaçados. Finalmente, outra forma de realização da presente invenção, a construção da fibra (isto é, fio) é organizada numa organização hierárquica de quatro níveis, a dita organização hierárquica de quatro níveis compreendendo uma corda dos filamentos entrelaçados.

A sericina pode ser removida das fibras de fibroína antes do alinhamento num fio ou num nível superior na geometria hierárquica da construção da fibra. O fio é manuseado em baixa tensão (isto é, a força aplicada na construção nunca vai exceder o limite de elasticidade do material durante qualquer passo de processamento) e com cuidado geral após a sericina ser removida. O equipamento de processamento é igualmente configurado para reduzir abrasividade e ângulos agudos nos dispositivos de fixação guia que estão em

contacto e orientam o fio durante o processamento para proteger as frágeis fibras de fibroína de danos; os tempos de residência de extracção de 1 hora são suficientes para extrair sericina mas lentos o suficiente para não danificar os filamentos expostos. Curiosamente, quando uma construção de fibra de seda consistindo de fibras múltiplas organizadas em paralelo tenha sido extraída sob estas condições, originou um "único" fio sem sericina maior (isto é, as fibras individuais não podem ser separadas da construção devido à interacção mecânica entre os filamentos de fibroína mais pequenos, uma vez expostos durante a extracção). Além disso, como resultado da interacção mecânica entre os microfilamentos livres de sericina, extracção de fios torcidos ou cablados, resultou, normalmente, em menos fios e estruturas "activas". Como resultado deste fenómeno, existiu um maior grau de flexibilidade na criação de fios e tecidos resultantes; por exemplo, maiores níveis de torção por polegada (TPI) podem ser usados, o que normalmente cria fios activos que seriam difíceis de formar em tecidos. O benefício acrescentado de TPI mais elevada foi a redução na rigidez do fio e tecido (isto é, a elasticidade da matriz pode ser aumentada) (Tabelas 6 e 7; Fig. 6A e Fig. 6B).

Vários fios são entrelaçados para formar um tecido. Os tecidos são criados através da união de um ou mais fios individuais em que os fios individuais são transformados em tecidos de dispositivo médico têxtil. Numa forma de realização da presente invenção, o fio é torcido em ou abaixo das 30 torções por polegada. Os tecidos são produzidos ou formados por fios combinados de forma não aleatória: união ao tecer, tricotar ou costurar para produzir tecidos completos. Numa forma de realização, esta combinação de fios para formar um tecido é feita numa máquina. Contudo, é muito importante notar que o produto

tecido final é distinto baseado no tipo de fio usado para que, deste modo, providencie tremenda energia através do *design* do fio para satisfazer as necessidades clínicas. Um tecido pode ser, mas não é limitado a tecido, malha, malha-urdidura, ligado, revestido, de maquina, laminado, rede ou combinações dos mesmos.

De notar, os métodos têxteis de entrançar, além de criar fios, podem também ser usados para produzir tecidos, tais como um tecido entrançado plano ou um entrelaçado circular maior (Fig. 4A). Inversamente, tecer e tricotar, dois métodos que produzem tecido, apesar de não serem comumente usados, podem também ser usados para produzir fios. Em tais condições, a diferenciação entre um "fio" e um "tecido" não é inteiramente aparente, e deve ser usada homogeneidade para distinguir claramente, isto é, um fio é normalmente mais homogêneo em composição e estrutura do que um tecido.

Numa forma de realização da presente invenção, múltiplas fibras de seda de bicho-da-seda podem ser organizadas helicoidalmente (por ex., torcidas ou cabladas) ou em paralelo, num único nível hierárquico ou em múltiplos níveis, extraídas, e usadas para criar uma sutura entrelaçada para ligação de tecido. Noutra forma de realização, a interacção mecânica de filamentos de fibroína extraídos numa configuração torcida ou cablada após a extracção pode ser usada como uma sutura médica.

Os tecidos não tecido podem ser formados ao organizar de forma aleatória uma pluralidade de fios, ou um único fio cortado em muitas pequenas peças. Exemplos não limitativos incluem um tecido para hemostato ou suporte de osso.

Todos os tecidos podem derivar de uma única construção de

fio (homogénea) ou várias construções de fios (heterogénea). A capacidade de conceber uma variedade de estruturas de fio de fibroína de seda, como descrita com mais pormenor mais adiante, aumenta dramaticamente o potencial de *design* do tecido quando considerando uma estrutura de tecido heterogénea.

Numa forma de realização da presente invenção, o tecido é um composto das fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina ou fios e um ou mais polímeros degradáveis seleccionados do grupo que consiste de colagénios, ácido poliláctico ou seus copolímeros, ácido poliglicólico ou seus copolímeros, polianidridos, elastina, glicosaminoglicanos e polissacarídeos. Além disso, o tecido da presente invenção pode ser modificado para compreender um fármaco associado ou factor de união de célula associado ao tecido (isto é, RGD). Numa forma de realização da presente invenção, o tecido é tratado com plasma de gás ou inoculado com células biológicas.

Aspectos adicionais desta descrição relacionam-se com a reparação de tecidos corporais específicos, tal como a reparação de hérnia, tecidos da bexiga e suportes, reconstrução do chão pélvico, tecidos da parede peritoneal, vasos (por ex., artérias), tecido muscular (músculo liso abdominal, cardíaco), hemostatos, e ligamentos e tendões do joelho e/ou ombro, assim como outras estruturas frequentemente danificadas devido a trauma e desgaste crónico. Exemplos de ligamentos ou tendões que podem ser produzidos incluem ligamentos cruzados anteriores, ligamentos cruzados posteriores, tendões do manguito rotador, ligamentos colaterais médios do cotovelo e joelho, tendões flexores da mão, ligamentos laterais do tornozelo e tendões e ligamentos do maxilar ou articulação

temporomandibular. Outros tecidos que podem ser produzidos por métodos desta descrição incluem a cartilagem (articular e meniscal), osso, pele, vasos sanguíneos, *stents* para suporte e/ou reparação de vasos, e tecido conectivo mole geral.

Em outros aspectos, as fibras de fibroína do bicho-da-seda, na forma de um fio ou de uma grande construção de fios, agora chamado de dispositivo, ficam sem sericina, e transformadas (por ex., tecido, tricotado, não tecido obtido via húmida, entrelaçado, costurado, etc.) num tecido, esterilizadas e usadas como um material de suporte ou reparação implantável que oferece um tempo útil controlável de vida (isto é, taxa de degradação) e um grau controlável de colagénio e/ou deposição de matriz extracelular. O material de suporte ou reparação pode ser usado para qualquer dito propósito no corpo, e em particular, pode ser usado para reparação de hérnia, reconstrução de paredes corporais, particularmente no tórax e cavidade abdominal, e suporte, posicionamento ou imobilização de órgãos internos, incluindo, sem limitação, a bexiga, o útero, os intestinos, a uretra e ureteres.

Alternativamente, pode ser retirada sericina às fibras de fibroína de bichos-da-seda e organizadas num tecido não tecido. Tal tecido não tecido pode ser usado como um material de suporte ou reparação implantável como acima descrito, mas mais especificamente para aplicações onde uma formação de esponja pode ser útil.

A seda purificada pode ser purificada por qualquer uma das variedades de tratamentos que removem as proteínas de sericina encontradas nas fibrilhas nativas. A sericina tem sido suficientemente removida quando os implantes de seda

purificada provocam apenas uma reacção de corpo estranho transiente na ausência de uma resposta antigénica (célula B, célula T), isto é, são biocompatíveis. Uma reacção de corpo estranho é caracterizada por uma camada interna de macrófagos e/ou células gigantes com uma zona secundária de fibroblastos e tecido conectiva. O grau de resposta de corpo estranho mostrou ser controlável através de modificação de fibroína (Fig. 13 A-D e Fig. 18 A-C) e *design* do fio (Fig. 19 A-D). A sericina pode ser removida de fibras de fibroína de bicho-da-seda individual, um grupo de fibras de fibroína de bicho-da-seda (por ex., um fio), tendo uma orientação organizada (paralelas ou torcidas), ou forma um tecido que compreende uma pluralidade de fios. A construção pode ser esterilizada e implantada num organismo como um dispositivo médico.

Outras características e vantagens da invenção tornar-se-ão aparentes na seguinte descrição de formas de realização preferidas da mesma.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1A é uma imagem de um microscópio electrónico de varrimento (SEM) de uma única fibra de seda nativa com *denier* 20/22, degomada e dobrada com um revestimento de sericina.

A Fig. 1B ilustra SEM da fibra de seda da Fig. 1A, extraída durante 60 minutos a 37 °C.

A Fig. 1C ilustra SEM da fibra de seda da Fig. 1A, extraída durante 60 minutos a 90 °C, e ilustrando uma remoção completa do revestimento de sericina.

A Fig. 1D é um gráfico que mostra uma resistência à tracção

(UTS) e rigidez (N/mm para uma matriz de 3 cm de comprimento) como uma função de condições de extracção.

A Fig. 1E ilustra SEM de uma fibroína de seda pura. A Fig. 1F ilustra uma primeira extracção a 90° durante 60 minutos. A Fig. 1G ilustra uma segunda extracção sob condições idênticas. Estas figuras mostram danos mecânicos aos filamentos que resultam numa perda típica de 3% de massa após a segunda extracção. Por conseguinte, desde que a % de perda de massa não altere mais de 3% da primeira à segunda extracção (90 °C, 1 hora, detergente normal e sal), é assumido que foi atingida a extracção completa. A utilidade de uma perda de 3% na perda total de massa reflecte a variabilidade nas medições, ensaios e danos mecânicos resultantes na perda de massa do fio após a segunda extracção.

A Fig. 2A é um modelo 3D representativo de um fio (cablado ou torcido) representando os seus 5 níveis de hierarquia (nível único de fibra não mostrado). Dependendo do número de fibras usado em cada nível, a corda pode servir como um fio para criar uma rede de reparação de hérnia ou como uma corda a ser usada em paralelo com outras cordas para formar uma matriz ACL.

A Fig. 2B é um esquema que representa a geração de fio torcido ou em cabo hierárquico de dois níveis, contendo 36 fibras antes de ser torcido em paralelo, para formar uma matriz ACL, ou usado para gerar um ligamento do tecido ou tricotado para fabrico de tecido e reparação de tecido (por ex., rede de hérnia). As representações esquemáticas definem visualmente duas formas muito populares de formações de tecido: "tecer" e "tricotar."

A Fig. 2C ilustra uma única corda de fio com uma geometria que é helicoidalmente organizada sobre um eixo central e composta por dois níveis de hierarquia de torção. Quando seis cordas são usadas em paralelo (por ex., Matriz 1), o fio tem propriedades mecânicas semelhantes ao ligamento nativo.

A Fig. 2D ilustra uma única corda de fio com uma geometria que é helicoidalmente organizada sobre um eixo central e composta por três níveis de hierarquia de torção. Quando seis cordas são usadas em paralelo (por ex., Matriz 2), a matriz tem propriedades mecânicas semelhantes ao ligamento nativo.

A Fig. 3A ilustra curvas de alongamento de carga para cinco amostras (n=5) da Matriz 1 formadas a partir de seis cordas de fibroína de seda paralelas, ilustradas na Fig. 2A.

A Fig. 3B é um gráfico de ciclos para falha na UTS, cargas de 1680N e 1200N (n=5 para cada carga), ilustrando os dados de fadiga da Matriz 1. A análise de regressão de dados de fadiga da Matriz 1, quando extrapolada a níveis de carga fisiológica (400 N) para prever o número de ciclos de falha *in vivo*, indica uma vida de matriz de 3,3 milhões de ciclos.

A Fig. 3C ilustra curvas de alongamento de carga para três amostras (n=3) da Matriz 2 (n=3) formadas a partir de seis cordas de fibroína de seda paralelas, ilustradas na Fig. 2B.

A Fig. 3D é um gráfico de ciclos para falha na UTS, cargas de 2280N, 2100N e 1800N (n=3 para cada carga), ilustrando os dados de fadiga da Matriz 2. A análise de regressão de dados de fadiga da Matriz 2, quando extrapolada a níveis de carga fisiológica (400 N) para prever o número de ciclos de falha

in vivo, indica uma vida de matriz superior a 10 milhões de ciclos.

A Fig. 4A mostra imagens de múltiplas formas de fio e tecido geradas nos nossos laboratórios. Várias estruturas de fio diferentes, incluindo vários tipos de entrançados (i, ii, iv), um entrançado liso (iii), um diâmetro variante ou entrelaçado cônico (v), um conjunto de dois níveis cablado maior (~250 fibras) (vi), um fio paralelo torcido e unido (estampado) consistindo de fios texturizados de 24-12 fibras (vii), uma variedade de fios torcidos (viii-xi), e um fio torcido e unido de forma paralela (estampado) consistindo de fios de cabo de dois níveis de 24-12 fibras (xii).

A Fig. 4B é um gráfico de curvas de alongamento de carga para (I) um entrançado (48 fibras, um entrançado de 4 portadores usando fio de 12 fibras extraídas torcidas) e fios texturizados (48 fibras no total) e (II) torcidos em comparação aos fios de cabo, 12 fibras no total - todas as amostras tinham 3 cm de comprimento.

A Fig. 4C é um gráfico de dados de fadiga para pequenos fios, 3 cm de comprimento, como comparado a 3B e 3D para (I) um pequeno cabo de 36 fibras e (II) um pequeno fio texturado de 60 fibras).

A Fig. 5A providencia dados de resistência e rigidez para um fio de 36 fibras como uma função de 6 taxas diferentes de tensão nas quais foram testadas (N=5 por grupo).

A Fig. 5B mostra curvas de alongamento de carga para um fio de 36 fibras, 3 cm de comprimento, testado nas 2 das 6 diferentes taxas de tensão. Os dados representam o efeito dos procedimentos de teste (aqui, especificamente de taxa de

tensão) nas propriedades mecânicas reportadas (por ex., UTS) da estrutura de fio.

A Fig. 6A é um gráfico de UTS como uma função de torções por polegada (TPI); as linhas de tendência foram geradas para extrapolar dados até uma 4ª ordem polinomial - são mostradas TPI de 0-15. Um máximo foi observado indicando uma estrutura ordenada onde os filamentos individuais trabalham em uníssono.

A Fig. 6B é um gráfico de rigidez (para uma amostra de comprimento de 3 cm) como uma função de torções por polegada (TPI); as linhas de tendência foram geradas para extrapolar dados para uma 5ª ordem polinomial- são mostradas TPI de 0-15. Foi observado um máximo indicando que a TPI pode ser usada como uma ferramenta para conceber uma UTS ou rigidez específicos.

A Fig. 7A ilustra SEM de fibroína de seda extraída antes da inoculação com células.

A Fig. 7B ilustra SEM de células estromais da medula óssea inoculadas e anexadas em fibroína de seda, imediatamente após a inoculação.

A Fig. 7C ilustra SEM de células da medula óssea anexadas e difundidas em fibroína de seda, 1 dia após inoculação.

A Fig. 7D ilustra SEM das células estromais da medula óssea inoculadas em fibroína de seda, 14 dias após inoculação que forma uma folha matriz extracelular de célula intacta.

A Fig. 8A ilustra um comprimento de 3 cm da corda de fibroína de seda ilustrada na Fig. 2C, e inoculada com

células estromais da medula óssea, cultivada durante 14 dias num ambiente estático e marcada com MTT para mostrar até mesmo a cobertura de célula da matriz após o período de crescimento.

A Fig. 8B ilustra um filamento de controlo da corda de fibroína de seda com 3 cm de comprimento marcado com MTT.

A Fig. 9A é um gráfico que ilustra proliferação de células estromais da medula óssea na Matriz 1 de fibroína de seda determinada por um ADN celular total durante um período de cultura de 21 dias, indicando um aumento significativo na proliferação de células após 21 dias de cultura.

A Fig. 9B é um gráfico de barras que ilustra a proliferação de células estromais da medula óssea na Matriz 2 de fibroína de seda determinada por um ADN celular total durante um período de cultura de 14 dias, indicando um aumento significativo na proliferação de células após 14 dias de cultura.

A Fig. 10 ilustra a resistência à tracção da construção extraída de 30 fibras de seda que é inoculada com células estromais da medula óssea ou não inoculada durante 21 dias de cultura nas condições de crescimento fisiológicas.

A Fig. 11A é um gráfico de UTS como uma função de degradação enzimática *in vitro*; não foi observada perda de força no controlo negativo, PBS. A seda perde 50% da sua resistência após 21 dias em cultura. Foi usada uma solução de 1 mg/ml de Protease XIV de SIGMA.

A Fig. 11B é um gráfico de perda de massa como uma função de degradação enzimática *in vitro*; não foi observada perda

de resistência no controlo negativo, PBS. Foi observada 50% de perda de massa após 41 dias em cultura.

A Fig. 12 é um gráfico de perda de UTS como função da degradação *in vivo* após implantação de matriz modificada por RGD num modelo de rato subcutâneo não carregado para 10, 20 e 30 dias. Foi observado 50% de perda de resistência após ~10 dias *in vivo* num ambiente não carregado.

A Fig. 13A mostra secções histológicas de 12(0) x 3(8) não modificadas e matrizes de fibroína de seda sem sericina modificadas com RGD após 30 dias de implante subcutâneo num rato Lewis. A fila I é coloração H&E a 40X, a fila II é coloração H&E a 128X, a fila III é coloração colagénio tricromo a 128X, a fila IV é colagénio retirado das imagens da fila III para permitir a qualificação do crescimento do colagénio, e a fila V são os píxeis associados às secções de fibroínas de seda remanescentes, retirados para permitir uma quantificação de degradação. Após avaliação qualitativa, no ambiente subcutâneo, ambos os grupos não tratados e modificados apoiam o crescimento da célula e deposição de colagénio dentro da própria matriz com encapsulamento periférico limitado.

A Fig. 13B representa quantitativamente uma diminuição de 36% na área transversal de seda modificada por RGD após 30 dias de implantação subcutânea, indicando um melhoramento significativo na capacidade do anfitrião em degradar a superfície modificada de matrizes de fibroína de seda quando comparado com controlos não tratados.

A Fig. 13C mostra quantitativamente um aumento significativo de 63% na deposição de colagénio dentro das matrizes de fibroína modificada por RGD, como comparado com os controlos

não tratados, demonstrando novamente a capacidade da matriz de seda modificada em suportar a célula anfitriã e crescimento de tecido.

A Fig. 13D mostra a coloração H&E de um fio de fibroína de 36 fibras extraídas implantado intramuscularmente no abdominal de um rato Lewis. As imagens são mostradas a 40x e 128x para matrizes não modificadas e modificadas por RGD. Os resultados mostram, qualitativamente, que a modificação por RGD aumentou dramaticamente a infiltração de células e tecido nos 30 dias *in vivo*. Ao contrário da sutura de seda entrelaçada negra ou sutura de seda virgem, não foram observados encapsulamentos periféricos ou células plasma. Comparado com os implantes subcutâneos, foi observada pouca ou nenhuma infiltração de célula e deposição de colagénio nos controlos não tratados, indicando o efeito do local de implantação adicionalmente à modificação de superfície.

A Fig. 13E é uma representação numérica de perda de massa *in vivo* de dois grupos de modificação diferente comparado com controlos não tratados. A modificação por RGD, seguida por uma modificação de plasma de gás aumentou significativamente ($p < 0,05$) a extensão da degradação após 90 dias de implantação intramuscular. Contudo, parece que a degradação foi mais agressiva no ambiente subcutâneo como comparado com ambiente intramuscular, como foi esperado.

A Fig. 14 ilustra análise electroforética de gel de amplificação RT-PCR de marcadores seleccionados ao longo do tempo. O gel mostra supra-regulação nos tipos I e III dos níveis de expressão normalizados para o gene regulador, GAPDH por crescimento de células estromais da medula óssea na Matriz 2 durante 14 dias em cultura. O colagénio tipo II (como um marcador de cartilagem) e sialoproteína óssea (como

um marcador da formação de tecido ósseo) não foram detectados indicando uma resposta de diferenciação específica de ligamento por BMSC quando cultivado com Matriz 2.

As Figs. 15A e 15B ilustram uma única corda de Matriz 1 (não inoculada no momento da implantação) após seis semanas de implantação *in vivo* e usada para reconstruir o ligamento colateral médio (MCL) num modelo coelho. A Fig. 15A mostra as fibras de fibroína de Matriz 1 rodeadas por células anfitriãs progenitoras e crescimento de tecido na matriz e em redor de fibras de fibroína individuais visualizadas pela marcação através de hematoxilina e eosina. A Fig. 15B mostra um crescimento de tecido colagénio na matriz e em redor das fibras de fibroína individuais visualizadas por coloração tricromo.

As Figs. 16A, 16B e 16C ilustram células estromais da medula óssea inoculadas e crescidas em fibras de colagénio durante 1 dia (Fig. 16A) e 21 dias (Fig. 16B); RT-PCR (Fig. 16C) e análise electroforética de gel da expressão de colagénio I e III vs. o gene regulador GAPDH: a= Colagénio I, dia 14; b = Colagénio I, dia 18; c = Colagénio III, dia 14; d = Colagénio III, dia 18; e = GAPDH, dia 14; f = GAPDH, dia 18. O colagénio tipo II (como marcador para cartilagem) e sialoproteína óssea (como marcador de formação de tecido ósseo) não foram detectados indicando uma resposta de diferenciação específica de ligamento.

A Fig. 17 ilustra um RT-PCR quantitativo em tempo real aos 14 dias que produziu um rácio transcrito de colagénio I para colagénio III, normalizado para GAPDH, de 8,9:1.

A Fig. 18A e Fig. 18B são secções marcadas com H&E de 6

conjuntos de (A) sutura de seda entrelaçada negra 2-0 e (B) seda modificada com RGD na superfície (36 fibras/conjunto), respectivamente, 30 dias após a implantação intramuscular. A Fig. 18C é seda modificada por RGD pré-inoculado com BMSC durante 4 semanas antes da implantação. A Fig. 18A mostra uma reacção de corpo estranho típica e extensa à sutura de seda entrelaçada negra (Ethicon, Inc.) comercialmente disponível onde não pode ser observado nenhum crescimento ou infiltração de célula. A Fig. 18B demonstra a capacidade de seda fabricada para promover o crescimento de célula e tecido. As Figs. 18A, 18B e 18C ilustram a resposta de tecido às construções de fibra de seda que são revestidas com cera (Fig. 18A), sem sericina e revestidas com RGD (Fig. 18B), e sem sericina e inoculadas com células estaminais adultas progenitoras (Fig. 18C).

As Figs. 19 A-D mostram imagens de secções marcadas com H&E a 40X (fila superior, Fig. 19A e Fig. 19B) e 128X (fila inferior, Fig. 19C e 19D) de dois fios (4x3x3 e 12x3), cada um contendo o mesmo número de fibras, mas organizado de forma diferente com hierarquias específicas após a implantação num modelo rato durante 30 dias. A indicação dos resultados é que o *design* do fio e estrutura podem influenciar a extensão do crescimento da célula tecido uma vez que a construção do fio 12x3 permite o crescimento, enquanto parece que o 4x3x3 o ultrapassou.

As Figs. 20 A, B e C são imagens de (A) fibra única do tecido não tecido obtido via húmida extraída após formação de tecido (as fibras podem ser primeiro extraídas e formadas em não tecido - informação não mostrada), (B) um tecido de malha produzido a partir de uma forma de cadeia costurada, usando um fio de 12 fibras extraído após a formação de tecido, e (C) um tecido produzido a partir de um fio de 12

fibras pré-extraído com um fio de 36 fibras pré-extraído que se dirige para a direcção esquerda.

A Fig. 21 é um gráfico de fluxo esquemático dos vários métodos e sequências que podem ser usados para criar uma matriz de seda de fibroína biodegradável e biocompatível. Por exemplo, extrair uma única fibra, dobrar em fios e tecer em tecidos OU dobrar fios, torcer fios dobrados, formar tecido e de seguida extrair. Existe um número quase infinito de combinações, mas tudo vai depender da hierarquia do fio, o número de fibras por nível e a TPI por nível como mostrado nas Tabelas 4, 6, 7,8.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Nos métodos descritos com maior detalhe, em baixo, as fibras de fibroína de seda são alinhadas numa orientação paralela; as fibras podem permanecer numa orientação estritamente paralela, ou podem ser torcidas ou, pelo contrário, entrelaçadas para formar um fio. O fio pode incluir qualquer número de hierarquias, começando no nível de fibras e expandindo através do conjunto, filamento, corda, etc., níveis. O entrelaçamento pode ser provido em cada nível. Além disso, a sericina é extraída das fibras de seda em qualquer ponto da hierarquia até ao ponto onde o número de fibras excede aquele, no qual, a solução de extracção pode penetrar em todo o fio. O número máximo de fibras de fibroína do bicho-da-seda (*denier* 20/22 como adquirido) que pode ser combinado e extraído com sucesso é cerca de 50 (Tabela 4). Estes fios podem então ser usados como uma construção de fibra a qual é incorporada num tecido para uso, por ex., na geração de rede de tecido mole para reparações, tais como reparar hérnia, reconstrução de chão abdominal e suportes da bexiga. A formação das construções

da fibra será debatida no contexto das aplicações exemplificativas, em baixo.

Apesar de muito do debate que se segue ser dirigido à matriz com base na fibra de seda (isto é, construção, suporte) para a produção de um ligamento cruzado anterior (ACL), uma variedade de outrostecidos, tais como outros ligamentos e tendões, cartilagem, músculo, osso, pele e vasos sanguíneos, pode ser formada usando uma nova matriz à base de fibra de seda. No caso do ACL, foi descrito um grande fio (540-3900 fibras por fio, antes de dobrar em paralelo; ver Tabela 8 e 11) com vários níveis hierárquicos de entrelaçamento e propriedades fisiológicas relevantes. Adicionalmente à matriz ACL com base em fibra de seda, várias configurações de fio mais pequenas (1-50 fibras de seda) (Tabela 1, 4 e 5) com propriedades fisiológicas relevantes, após combinar em paralelo ou numa formação de tecido específico, podem servir como matrizes de tecido para formação de tecido orientada (Fig. 2A-B). Adicionalmente às matrizes de seda para formação de tecido orientada ou fabricada, este trabalho é dirigido especificamente para produzir uma variedade de tecido de matrizes com base em fibras de seda de estruturas de suporte para reparação de tecido orientado (por ex., reparação de hérnia, suportes da bexiga para incontinência urinária) (Fig. 2A-B e Fig. 20A-C).

As construções (isto é, tecidos ou fios) podem ser uma superfície modificada ou inoculada com as células adequadas (Fig. 7A-D, Fig. 8A-B e Fig. 16A-C) e expostas à estimulação mecânica adequada, se necessário, para proliferação e diferenciação no ligamento desejado, tendão ou outro tecido de acordo com as técnicas acima descritas.

As células estromais da medula óssea podem ser usadas para

inocular a construção de fibra, e outro progenitor, células pluripotentes e estaminais, tais como aquelas em ossos, músculos e pele, por exemplo, podem também ser usadas para diferenciar em ligamentos e outros tecidos.

Os tecidos podem também ser formados a partir de construções similares de filamentos purificados, e usados em várias aplicações. Os tecidos podem ser divididos em várias classes, incluindo tecido, não tecido, tecidos tricotados, e tecidos ligados por costura, cada um com vários subtipos. Cada um desses tipos é útil como um implante em circunstâncias particulares. Ao debater sobre estes tecidos com base em seda, descrevemos a seda natural, por ex., de *Bombyx mori*, como "fibra de fibroína." As fibras devem ter, pelo menos, um metro de comprimento, e este comprimento deve ser mantido ao longo de todo o processo para facilitar o seu manuseamento durante o processamento e incorporação no tecido. Dado que um fio pode ser definido como um conjunto de fibras torcidas ou, pelo contrário, mantidas em conjunto num filamento contínuo e que uma única fibra de fibroína, como acima definido, é compreendida por vários *broins* dobrados, por vezes, a partir de vários casulos, uma única fibra de fibroína pode ser denominada como "fio". Do mesmo modo, as fibras de fibroína são torcidas em conjunto ou, pelo contrário, entrelaçadas para formar um "fio". Os fios são usados para tecer ou tricotar tecidos. Num procedimento alternativo, os fios de seda são desagregados em comprimentos mais curtos (5 mm a 100 mm) ou em filamentos de fibroína de seda. Estes filamentos podem então ser dispostos (húmidos) para formar um tecido não tecido (Fig. 20A).

Quando os fios são formados num tecido, a tensão (força) exercida nos fios (normalmente, via maquinaria) não é

superior ao limite de elasticidade do fio (Fig. 3A-D). Consequentemente, os fios são manuseados a velocidades mais baixas e sob cargas mais baixas do que os fios, que são normalmente usados em, por ex., produção de têxteis quando formando o tecido de modo a preservar a integridade das fibras de fibroína frágeis expostas. Do mesmo modo, os pontos de contacto entre a maquinaria de manuseamento e o fio são desenhados para evitar ângulos agudos e interações de alta fricção de modo a evitar o afrouxamento e desfiamento das fibras em redor do perímetro do fio (Fig. 4A-C).

Várias aplicações de tecido são conhecidas nas técnicas médicas e cirúrgicas. Um exemplo é como um suporte numa reparação de hérnia. Para tal reparação, um tecido, mais habitualmente uma malha-urdidura com um ponto de malha desejado (por ex., um ponto atlas concebido para evitar um desfiamento da rede durante o corte), é cosido (ou por vezes agrafado ou colado) ou simplesmente disposto no local sem tensão, no interior da parede abdominal após ser reparada com suturas convencionais. Uma função do tecido de malha-urdidura é providenciar um suporte a curto prazo para a reparação. Numa forma de realização preferida da presente invenção, as fibras de fibroína no tecido promovem o crescimento de células e o subsequente crescimento de tecido no próprio tecido (Fig. 13A e 13D), assim como através dos interstícios do tecido formados durante a tecelagem e na região com necessidade de reparação. Esta forma de realização visa reforçar permanentemente a área danificada através do crescimento de tecido funcional e remodelar à medida que a matriz de seda se degrada (Fig. 13A, B e C).

Os tecidos de reforço de reparações são usados em situações semelhantes para a reparação ou suporte de qualquer parte da

parede abdominal, em particular na reparação de hérnia e reconstrução do chão abdominal, ou na reparação ou suporte de outras paredes e septos no corpo, por exemplo do peito, ou dos órgãos, tais como o coração ou a bexiga, em particular após a cirurgia ou remoção de tumor. Os tecidos implantáveis podem também ser usados para suporte de bexigas ou outros órgãos internos (incluído mas não limitado aos intestinos, aos ureteres ou uretra e ao útero) para retê-los nas suas posições normais após cirurgia, danos ou desgaste natural como um resultado da idade ou gravidez, ou para posicioná-los numa localização adequada. "Órgão" aqui inclui órgãos "sólidos", tais como fígado, e órgãos tubulares como um intestino ou uma uretra. Tecidos, especialmente tecidos volumosos, tais como alguns tipos não tecido ou aqueles que podem ser criados através de tecelagem ou entrelaçamento tridimensional (Fig. 4A-C), podem ser usados para preencher as cavidades deixadas pela cirurgia para providenciar uma construção de fibras para a qual as células podem migrar ou para a qual as células podem ser pré-anexas (por ex., para melhorar a taxa de reparação). Os locais de uso incluem cavidades nos tecidos moles e tecidos duros, tais como osso. Em outros casos, os tecidos são usados para evitar aderências, ou para evitar a fixação e/ou crescimento de células; isto pode ser atingido através da modificação da superfície da matriz de fibroína de seda ou através da fixação de um fármaco ou factor à matriz.

Os tecidos com base em fibroína de seda da invenção podem ser facilmente modificados de várias formas para melhorar a cicatrização ou reparação no local. Estas modificações podem ser usadas sozinhas ou em combinação. Os tecidos com base em fibroína de seda da invenção podem ser modificados na superfície para suportar a união e disseminação de células, o crescimento e remodelação do tecido e células, e

biodegradação do dispositivo através do uso de união de péptido RGD ou irradiação do plasma de gás (Figs. 13A-E). Os tecidos podem ser modificados para realizar os factores de união da célula, tais como o péptido bem conhecido "RGD" (ácido aspártico-arginina-glicina) ou qualquer um dos muitos materiais de promoção de fixação sintéticos e naturais, tais como soro, factores de soro e proteínas incluindo fibronectina, sangue, medula, grupos, determinantes, etc., conhecidos na literatura. Tais materiais podem ser em qualquer uma das classes bioquímicas normais de tais materiais, incluindo sem limitação, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, polissacarídeos, proteoglicanos, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas orgânicas pequenas (inferiores a cerca de 2000 Daltons) e combinações dos mesmos. Tal modificação de plasma pode melhorar a funcionalidade da superfície de tecido e/ou carga sem afectar as propriedades mecânicas dos materiais a granel. Os implantes de tecido podem ser irradiados de plasma de gás após a extracção de sericina sem comprometer a integridade das fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina (Tabela 9).

Adicionalmente, o tecido pode ser tratado de modo a administrar um fármaco. A fixação do fármaco no tecido pode ser covalente ou covalente via ligações degradáveis, ou por qualquer outra forma de ligação (por ex., atracção de carga) ou absorção. Qualquer fármaco pode ser potencialmente usado; exemplos não limitativos de fármacos incluem antibióticos, factores de crescimento, tais como proteínas morfogénicas ósseas (BMP) ou factores de diferenciação de crescimento (GDF), inibidores de crescimento, quimioatraentes e ácidos nucleicos para transformação, com ou sem materiais de encapsulamento.

Noutra modificação, as células podem ser adicionadas ao

tecido antes da sua implantação (Fig. 7A-D, Fig. 8A-B, e Fig. 9A-B). As células podem ser inoculadas/absorvidas em ou para o tecido. As células podem também, ou em adição, serem cultivadas no tecido como um primeiro passo na direcção da substituição ou melhoria do tecido. As células podem ser de qualquer tipo, mas as células alógenas, de preferência dos tipos de células estaminais, "imunoprotegidas", "imunoprivilegiadas", são preferidas, e as células autólogas são particularmente preferidas. As células são seleccionadas para serem capazes de proliferar nos tipos de células requeridas ou na construção de fibras (Fig. 9A-B).

Outra classe de modificação é a incorporação de outros polímeros (por ex., na forma de uma fibra ou gel) para o tecido para providenciar as propriedades estruturais específicas ou para modificar as superfícies nativas da fibroína da seda e as suas características biológicas (ver a Fig. 16A-C: inoculação de fibras de colagénio com BMSC). Num tipo de incorporação, as fibras e fios de seda e de outro material são misturados no processo de produção do tecido. Noutro tipo, as fibras, fios ou tecidos com base em seda são revestidos ou envolvidos com uma solução ou com fibras de outro polímero. A mistura pode ser executada (i) de forma aleatória, por exemplo por dobragem (1 ou várias fibras de) seda e o polímero em conjunto paralelamente antes de torcer ou (ii) e uma forma organizada tal como no entrelaçamento onde as fibras ou fios, sendo inseridas no fio ou tecido maior, podem alternar as posições de alimentação da máquina criando um resultado previsível. O revestimento ou envolvimento pode ser executado ao entrelaçar ou cablar num núcleo central, onde o núcleo pode ser o polímero, a fibroína de seda ou um composto de ambos, dependendo do efeito desejado. Alternativamente, um fio pode ser envolvido numa forma controlada sobre o outro polímero, onde o fio de

envolvimento pode ser usado para estabilizar a estrutura. Qualquer polímero biocompatível é potencialmente utilizável. Exemplos de polímeros adequados incluem proteínas, particularmente proteínas estruturais tais como colagénio e fibrina, e polímeros sintéticos degradáveis que providenciam força, tais como polímeros que compreendem anidridos, ácidos hidróxi, e/ou carbonatos. Os revestimentos podem ser providos como géis, particularmente géis degradáveis, formados por polímeros naturais ou de polímeros sintéticos degradáveis. Os géis que compreendem fibrina, colagénio, e/ou proteínas da membrana basal podem ser usados. Os géis podem ser usados para administrar células ou nutrientes, ou para proteger a superfície da fixação da célula. Além disso, as proteínas ou péptidos podem ser covalentemente ligados às fibras ou as fibras podem ser modificadas por plasma num gás carregado (por ex., nitrogénio) para depositar grupos aminos; cada um desses revestimentos suporta a fixação e crescimento da célula, uma vez que a seda é normalmente hidrofóbica, e esses revestimentos tornam as fibras mais hidrofílicas.

Exemplos não descritivos de algumas destas formas de realização são descritos nos exemplos, em baixo.

Foi seleccionada uma disposição húmida para um protótipo de formação de tecido porque é o procedimento mais simples. O produto não tecido (Fig. 20A) foi criado a partir de uma única fibra de fibroína de seda antes da extracção ao nível do tecido. O produto é correspondentemente um material relativamente barato, e pode ser usado em aplicações onde a sua baixa resistência à tracção seria satisfatória. Quando é necessária mais resistência à tracção, um material não tecido pode ser unido em conjunto, como será bem conhecido para tecidos e papel, ou mineralizado para reparação óssea.

Alternativamente, o material de fio de seda produzido pela extracção da sericina pode ser formado numa variedade de fios mais complexa, como acima descrito. O tamanho e *design* do fio podem ser usados para controlar a porosidade, independentemente das capacidades da máquina não tecido. Os fios podem também ser tricotados (Fig. 20B) ou tecidos (Fig. 20C) num tecido. Um tipo de tecido de interesse é uma simples rede, semelhante à gaze, a qual pode ser utilizada por si só, (por ex., como um hemostato), ou para administrar células ou fármacos (por ex., um factor de coagulação) a um local, numa situação onde a flexibilidade é importante.

Quando é importante a força, um tecido de malha-urdidura (Fig. 20B), incluindo os *tricots* e *jerseys* familiares, com uma elasticidade que pode ser controlada através do desenho helicoidal do fio usado no tecido, e resistência à tracção normalmente substancial, pode ser muito útil para aplicações (por ex., reparação da hérnia, suportes da bexiga, reconstruções de chão pélvico, etc.) requerendo provisão de apoio mecânico para uma duração significativa de tempo, tal como meses.

Noutras aplicações, o material deve ter um pouco de elasticidade e maior resistência. Para tais tecidos, uma tecelagem densa de fios espessos é adequada, produzindo um material semelhante aos tecidos tecido padrão (Fig. 20C). Tal material pode opcionalmente ser suplementado por um tratamento de revestimento ou um tratamento de calor para ligar os pontos de intersecção dos segmentos de fio, evitando deste modo o desfiamento e o esticamento. O tratamento de calor não deve totalmente desnaturar a proteína de seda. O tecido pode opcionalmente ser cosido, colado ou agrafado no local, uma vez que é actualmente realizado com rede de polipropileno. O implante, como

qualquer um dos outros tipos debatidos, pode ser revestido com vários materiais para aumentar a cicatrização local e processo de crescimento do tecido, e/ou com um revestimento para evitar a adesão do local da reparação para as vísceras.

Noutra alternativa, o tecido, rede, não tecido, malha ou outro material de reparação pode ser composto por seda não extraída, e de seguida, o tecido acabado pode ser extraído como aqui descrito (Fig. 21) (por ex., com solução detergente alcalina a uma temperatura elevada) para remover as sericinas imunomodulatórias do material. Como outra alternativa, a extracção da sericina pode ocorrer a uma fase intermédia, tal como uma extracção do fio formado, conjunto ou filamento, desde que o número de fibras não exceda aquele no qual a solução de extracção pode penetrar em todas as fibras (ver Fig. 21 para opções não limitativas).

O debate acima descreveu a produção de tecidos compostos por fio, onde a forma mais típica de fio nas formações de tecido debatidas vai derivar das fibras de fibroína de bicho-da-seda, torcendo em conjunto numa forma organizada e extraíndo sericina. Muitas das geometrias de fio e métodos de formação de fio podem também ser usados como descrito (Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8). Tais métodos podem incluir a formação dos conjuntos não torcidos de fibras de fibroína, unidas em conjunto ao envolver os conjuntos com seda ou outro material como acima debatido. Qualquer um desses fios pode, como acima descrito, ser formado por fibras de seda misturadas com outros materiais. Ainda, as fibras podem ser entrelaçadas, por ex., cabladas, torcidas, entrançadas, malhadas, tricotadas, etc. (Ver as Figs. 2A e B e 21). O termo "entrelaçado" é aqui usado para indicar uma estrutura de repetição organizada (isto é, não aleatória) em termos de como as fibras entram em contacto e se ligam umas com as

outras.

A mistura pode também ocorrer em altos níveis de organização, tal como o uso de filamentos de materiais diferentes para formar um fio mais grosso, ou usando fios de materiais diferentes na tecelagem ou tricotagem. Em cada caso, o material final incluiria seda purificada, essencialmente sem sericina, como um componente significativo, usada para uma ou toda a sua resistência e biocompatibilidade e (por ex., a longo prazo) características de degradação (Fig. 11A-B). O outro polímero ou polímeros são selecionados pela sua biocompatibilidade, suporte (ou inibição através de rápida formação de tecido em locais desejados), fixação ou infiltração de células (Fig. 16A-C), perfil de degradação *in vivo* e propriedades mecânicas. Os polímeros biodegradáveis incluem qualquer um dos polímeros biodegradáveis conhecidos, incluindo produtos naturais tais como proteínas, polissacarídeos, glicosaminoglicanos, e polímeros derivados naturais, por ex., celulosas; e polímeros e copolímeros sintéticos biodegradáveis, incluindo ácidos polihidroxí, policarbonatos, polianidridos, algumas poliamidas, e copolímeros e misturas dos mesmos. Em particular, o colagénio e elastina são proteínas adequadas.

As construções/matrizes de tecido com seda usadas para a reparação de tecido podem ser tratadas de modo a que contenham células no momento da implantação (Fig. 7A-D, Fig. 8A-B, Fig. 9A-B, e Fig. 18C) para melhorar os resultados de tecido *in vivo*. As células podem ser xenogénicas, mais preferencialmente alogénicas, e mais preferivelmente autólogas. Qualquer tipo de célula pode ser potencialmente usado, dependendo da localização e a função pretendida do implante. As células pluripotentes são preferidas quando os

sinais de diferenciação adequados estão presentes ou são providos no ambiente. Outros tipos de células incluem células osteogénicas, fibroblastos, e células do tipo de tecido do local de implantação.

Apesar de a seda de *Bombyx mori* e outros bichos-da-seda convencionais ter sido descrita, qualquer fonte de seda ou proteínas derivadas da seda pode ser usada na invenção, desde que não provoque mais do que uma reacção de corpo estranho suave na implantação (isto é, é biocompatível) (ver Fig. 18B e C). Esta inclui, sem limitação, sedas de bichos-da-seda, aranhas e células cultivadas, particularmente células geneticamente criadas, e plantas e animais transgénicos. A seda produzida por clonagem pode ser de sequências totais ou parciais de genes da linha da seda nativa, ou de genes sintéticos que codificam sequências tipo seda.

Enquanto em muitos casos apenas um único tipo de tecido será usado na formação de um dispositivo médico ou prótese, pode ser útil, em alguns casos, usar dois ou mais tipos de tecido num único dispositivo. Por exemplo, na reparação da hérnia, é desejável fazer com que o lado do tecido de reparação atraia células, enquanto a face peritoneal deverá repelir células de modo a evitar aderências. Este efeito pode ser atingido por ter uma camada de seda que não atrai células, e outra camada que sim (por exemplo, uma camada não tratada e uma camada com RGD, como no exemplo, em baixo). Outro exemplo inclui a formação de um suporte de bexiga. O suporte básico deve ser adaptado e de alguma forma elástico, e ter uma longa vida útil projectada. Contudo, a face do suporte mais próximo da bexiga deve ter a menor textura possível. Isto pode ser conseguido ao colocar uma camada de tecido, não tecido ou tecido tricotado fina mas firme,

fabricada a partir de fio com um pequeno diâmetro (por ex., uma única fibra), da invenção no suporte onde estará em contacto com a bexiga. O tecido não tecido deve ser tão pequeno quanto possível (*denier*). São possíveis várias outras situações que precisam de dois ou mais tipos de tecido.

Exemplos das estruturas acima descritas foram fabricados e avaliados numa série de testes. Num primeiro exemplo, um tecido foi formado a partir de fibrilhas de seda purificadas. Em primeiro lugar, a seda pura foi processada em fibrilhas de fibroína purificadas. As fibras de bicho-da-seda puras foram extraídas numa solução aquosa de 0,02 M Na_2CO_3 e 0,3% de peso por volume de solução IVORY com sabão durante 60 minutos a 90 graus C. As fibras extraídas foram lavadas com água para completar a extracção da proteína de sericina tipo cola. A suspensão resultante de fibrilhas foi obtida via húmida num filtro, perfurada com agulha, e seca (Fig. 20A). O material felpudo resultante parecia lã ao toque, e era muito poroso. Foi suficientemente interligado por enredamento e agulhamento, pelo que foi facilmente manuseado e cortado numa forma desejada.

Noutro exemplo, as fibrilhas de fibroína de seda purificada foram tratadas com agentes que atraem células (Tabela 9). Em primeiro lugar, os fios foram criados ao torcer em conjunto as fibras purificadas de fibroína de seda. Alguns fios foram criados por filamentos que foram derivados com o péptido RGD para atrair células, usando procedimentos descritos em Sofia et al, J. Biomed. Mater. Res. 54:139-148,2001. As secções de fios tratados e não tratados (sutura de seda entrelaçada negra) foram implantadas na parede abdominal de ratos (Fig. 18A-C). Após 30 dias de implantação as suturas entrelaçadas negras continham conjuntos de fibrilha compactos, com

infiltração de células entre os conjuntos de fibrilha mas não dentro deles. Em contraste, os conjuntos de fibrilha tratados com RGD foram extensivamente invadidos por células anfitriãs, e foram expandidos e não compactados (Fig. 13A-E, 18B), mas não foram ainda significativamente degradados (Fig. 13A-E).

Este exemplo ilustra o uso de derivatização para controlar a taxa de degradação de fibrilhas de fibroína de seda implantadas, assim como demonstrar a capacidade de fibrilhas derivadas para recrutar células para a estrutura tipo tecido. Claramente, uma especificidade maior de recrutamento pode ser obtida ao usar um atrativo mais específico. Técnicas similares (derivatização química) ou métodos mais simples, tais como absorção, adsorção, revestimento e embebedimento, podem ser usados para providenciar outros materiais ao local de implantação.

Cada uma das amostras indicadas nas Tabelas em baixo, foi preparada de acordo com a descrição acima, em que a sericina foi removida após 60 minutos a uma temperatura de $90^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Usando a temperatura neste intervalo para o período de tempo suficiente, foi descoberto que produz fibras das quais a sericina é substancialmente removida (Fig. 1A-C, Tabela 1, 2,3) (para produzir uma construção de fibra que é substancialmente livre de sericina de modo a não produzir uma resposta imunologicamente significativa e não impede significativamente a biodegradabilidade da fibra) enquanto preserva substancialmente a integridade mecânica da fibroína (Tabela 1). Note-se que quando as temperaturas atingem os 94°C (Tabela 1) a UTS não é dramaticamente afectada; contudo, a rigidez diminuiu significativamente indicando uma seda termossensível a temperaturas de 94°C e superiores. As fibras em cada grupo foram manualmente endireitadas (isto é,

tornadas paralelas) ao puxar as extremidades das fibras; alternativamente, o endireitamento pode facilmente ter sido executado via um processo automatizado. A força aplicada foi marginalmente superior do que foi requerido para endireitar o grupo.

As designações geométricas de amostra em todas as Tabelas reflectem as seguintes construções: n°. de fibras (tpi no nível de fibra na direcção S) x n°. de grupos (tpi no nível de grupo na direcção Z) x n°. de conjuntos (tpi no nível de conjunto na direcção S) x n°. de filamento (tpi no nível de cultura na direcção Z) x etc., em que as amostras são torcidas, entre níveis, excepto se indicado o contrário. A designação torção por polegada, tais como 10s x 9z tpi, reflecte (o número de torções das fibras/polegada dentro do grupo) x (o número de torções dos grupos/polegada dentro do conjunto). Em cada amostra, uma inclinação da torção é substancialmente superior do que é normalmente encontrada nos fios convencionais que são torcidos a uma baixa inclinação, meramente destinada a manter em conjunto as fibras. Aumentando a inclinação das torções (isto é, aumentando as torções por polegada) diminui a resistência à tracção, mas também diminui ainda a rigidez e aumenta o alongamento na falha da construção.

A resistência à tracção (UTS), percentagem de alongamento na falha (% Along), e rigidez foram todos medidos usando uma máquina de teste de material servo-hidráulico INSTRON 8511 com software FAST-TRACK, que forçou a amostra na taxa elevada de ~100% de comprimento da amostra por segundo numa análise puxar até falhar (pull-to-failure). Em outras palavras, até ao ponto de falha, a amostra é esticada para duplicar o seu comprimento a cada segundo, o que restringe bastante a capacidade da amostra em relaxar e recuperar

antes da falha. Contudo, a Fig. 5A-B demonstra o efeito que a taxa de tensão pode ter em propriedades mecânicas observadas, assim como condições de teste húmidas ou secas que são mostradas (Fig. 6A-B) para ter um efeito dramático na matriz de seda UTS e rigidez. A consistência é necessária se forem feitas comparações entre os conjuntos de dados. Os dados resultantes foram analisados usando software Instron Series IX. A resistência à tracção é o pico de tensão da curva de pressão/tensão resultante, e a rigidez é a inclinação da linha de pressão/tensão até ao limite de elasticidade. Excepto se especificado, pelo menos um N=5 foi usado para todos os grupos testados para gerar médias e desvios padrão. Os métodos estatísticos padrão foram usados para determinar se as diferenças estatisticamente significativas existiam entre os grupos, por ex., teste t de Student, teste one-way ANOVA.

As fibras de fibroína nas amostras em todas as Tabelas e Figuras acima (e em toda esta descrição) são nativas (isto é, as fibras não são dissolvidas e reformadas); a dissolução e reformulação das fibras resultam numa estrutura de fibras diferente com as propriedades mecânicas diferentes após reformação.

Surpreendentemente, estas amostras demonstram que os fios das fibras de fibroína de seda, a partir das quais a sericina foi completamente ou quase completamente removida, podem possuir altas resistências e outras propriedades mecânicas que tornam os fios adequados para várias aplicações biomédicas (Tabela 4, Fig. 2A-D e Fig. 20A-C), tais como para formar uma construção de fibra ou suporte para substituição de ligamentos, reparação de hérnia ou reconstrução de chão pélvico. Previamente, acreditava-se que a fibroína necessitava de ser dissolvida e extrudida

numa fibra reformulada para providenciar as propriedades mecânicas desejadas. Foi geralmente descoberto que a resistência à fadiga é prejudicada nas ditas fibras de fibroína reformada. Os métodos da presente invenção permitem a remoção de sericina sem uma perda significativa de resistência (Tabelas 1 e 4; Figs. 3A-D e 4A-B).

Na Tabela 8, as amostras 1 e 2 comparam as propriedades de um grupo de 3 fibras (amostra 1) com aquelas de um grupo de 4 fibras (amostra 2). A amostra 2 tinha uma configuração quadrada de fibras, enquanto as fibras de amostra 1 tinham uma configuração triangular. Como mostrado na Tabela, a adição da fibra extra na amostra 2 baixou a rigidez por fibra da amostra que demonstra a capacidade de controlar as propriedades do fio e tecido através do *design* hierárquico.

A Tabela 4 ilustra os efeitos de configurações diferentes das construções de fibra cabladas e uma geometria de fibras torcidas. Note-se, em particular, que as amostras 7 e 8 incluem o mesmo número de fibras e o mesmo número de níveis geométricos. A geometria de fibras torcidas da amostra 8 oferece uma UTS maior e maior rigidez, enquanto a geometria cablada da amostra 7 tem menor resistência e rigidez inferior. Das amostras 7-9, a geometria cablada da amostra 7 tem o maior rácio de resistência para rigidez; para uso como uma construção de fibra ACL é desejado um rácio elevado de resistência para rigidez (isto é, possuindo uma elevada resistência e baixa rigidez).

As Tabelas 1 e 4 demonstram o efeito de extracção da sericina nas fibras. Todas as amostras foram imersas numa solução de extracção, como descrito na Tabela 1. As amostras 1-5 foram imersas num banho à temperatura ambiente, a 33 °C e 37 °C. Acredita-se que estas temperaturas sejam muito

baixas para providenciar uma extracção de sericina significativa. As amostras 6-9 foram extraídas a 90 °C, onde é possível ser atingida a extracção de sericina completa, mas em períodos alternados. Do mesmo modo, a amostra 10 foi extraída na temperatura ligeiramente superior de 94 °C. Os dados sugerem que 30 a 60 minutos a 90 °C é suficiente para remover significativamente sericina (ver Tabelas 2 e 3) e que 94 °C pode danificar a estrutura de proteína de seda como mostrado por uma diminuição dramática na rigidez.

Finalmente, as amostras 11 a 16 têm geometrias cabladas comparáveis; as fibras de amostras 12, 14 e 16 foram extraídas, pelo que as fibras de amostras 11, 13 e 15 não foram. Como pode ser visto na Tabela, a extracção parece ter tido pouco efeito nas resistências à tracção (elevadas) por fibra.

As fibras da amostra 10 da Tabela 4 foram sujeitas ao procedimento de rotação - contracção, em que as fibras foram torcidas numa direcção e depois na direcção oposta, rapidamente; as fibras foram então aquecidas para prenderem na estrutura torcida e testada não extraída. A resistência e rigidez do fio resultante foram comparativamente inferiores às da maioria dos outros fios não extraídos testados. Contudo, as Tabelas 6 e 7 mostraram a capacidade notável de fibroínas, pós-extracção para suportarem até 30 TPI. A Tabela 6 mostra o efeito de ordenação que o TRI tem nas matrizes de seda, provavelmente devido à ordenação da estrutura multifilamento após a extracção.

A Fig. 10 demonstra as propriedades de um grupo de 30 fibras de fibroína paralelas inoculadas e não inoculadas em condições de cultura durante 21 dias. Estas três amostras exibem propriedades mecânicas similares, reflectindo, desse

modo, pouca, se alguma, degradação de matrizes de seda devido ao crescimento celular aí ou devido ao tempo *in vitro*. Os valores de rigidez são provavelmente muito baixos nesta experiência na comparação com as outras amostras como um resultado dos 21 dias de incubação húmida anterior ao teste mecânico (ver Tabela 5).

Tabela 4, as amostras 14-16 são todas amostras entrelaçadas. As fibras da amostra 14 foram entrelaçadas a partir dos oito portadores, com um carretel montado em cada portador, em que duas fibras foram retiradas de cada carretel. As fibras da amostra 15 foram retiradas a partir dos 16 portadores, com um carretel montado em cada portador; novamente, duas fibras foram retiradas de cada carretel. Finalmente, a amostra 16 foi formada a partir de 4 fios, cada fio compreendendo 3 grupos torcidos de quatro fibras (providenciando um total de 12 fibras por fio); cada um dos fios foi retirado a partir do carretel e portador separado.

A Tabela 9 demonstra o efeito da modificação de superfície. A designação "PBS" reflecte que as amostras foram imersas numa solução salina fosfato-tamponada durante cerca de 24 horas antes do teste. O efeito de exposição das amostras à solução salina foi medido e provida uma indicação de que a construção de fibra pode manter as suas características mecânicas e substancialmente preservar a estrutura de proteína inerente num ambiente salino (por ex., dentro do corpo humano). A designação "RGD" reflecte que as amostras foram imersas numa solução salina arg-gly-asp (RGD) durante cerca de 24 horas antes do teste. O RGD pode ser aplicado à construção para atrair células para a construção e, deste modo, promover o crescimento de células depois disso. Consequentemente, qualquer efeito de RGD nas propriedades mecânicas da construção é algo de interesse, apesar de não

ter sido aparente nenhuma degradação significativa da construção.

Consequentemente, estas amostras oferecem provas de que a exposição prolongada a uma solução salina ou esterilização de ácido de etileno gasoso ou a uma solução RGD resulta em pouca, se alguma, degradação das propriedades do material das construções da fibra.

Assim, os dados associados às amostras 28 e 29, em que a hierarquia geométrica foi estendida a um nível maior, revelam que a UTS/fibra diminui à medida que níveis maiores (e uma contagem de fibra geral aumentada) são atingidos. Este é um efeito de *design* hierárquico (Tabela 8) em vez da modificação da superfície.

Tabela 4, as amostras 18 a 23 foram esticadas sob aproximadamente 3 kg de força constante durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias, respectivamente, antes de testar para avaliar o efeito da tensão nas propriedades mecânicas ao longo do tempo. A partir dos dados, não parece ser muita, se alguma, mudança nas propriedades do material da construção, na medida que o procedimento de pré-tensão é estendido ao longo de períodos de tempo maiores. A amostra 25 foi também "pré-esticada" (após torção) em força, de aproximadamente 3 kg, para um dia antes do teste; para comparação, a amostra 24, que tinha uma configuração geométrica idêntica não foi pré-esticada. As amostras 24 e 25 revelam, consequentemente, o efeito do pré-tensionamento da construção para remover a folga na estrutura, o que resulta numa redução ligeira em ambas as UTS da construção e o seu alongamento na falha.

A construção com base em fibra de seda serve como uma matriz para células infiltrantes ou já infiltradas, ou

inoculadas com células, tais como progenitoras, ligamento ou tendão ou fibroblastos ou células musculares, que podem proliferar e/ou diferenciar para formar um ligamento cruzado anterior (ACL) ou outro tipo de tecido desejado. A nova construção com base em fibra de seda é concebida com fibras em qualquer uma das variedades de geometrias de fio, tal como um cabo, ou uma estrutura entrelaçada, tal como fio torcido, entrelaçado, fio tipo rede ou fio tipo malha.

O fio exhibe propriedades mecânicas que são idênticas ou quase idênticas àsquelas de um tecido natural, tal como um ligamento cruzado anterior (ver Tabelas 4, 1, em baixo); e variações simples na organização de construção de fibras e geometria podem resultar na formação de qualquer tipo de tecido desejado (ver Tabela 10, em baixo). Alternativamente, uma pluralidade de fios pode ser formada num tecido ou outra construção que é implantado para posicionar ou suportar um órgão. Adicionalmente, a construção pode ser usada para encher as cavidades internas após cirurgia ou para evitar as aderências de tecido ou promover a fixação ou crescimento de células.

As células estromais da medula óssea pluripotentes (BMSC), que são isoladas e cultivadas como descrito no seguinte exemplo, podem ser inoculadas numa construção de fibras de seda e cultivadas num reactor biológico sob condições estáticas. As células inoculadas na construção de fibras, se dirigidas adequadamente, vão submeter-se à diferenciação específica do ligamento e tendão, formando um tecido viável e funcional. Além disso, as propriedades histomorfológicas de um tecido produto de bioengenharia produzido *in vitro*, gerado a partir de células pluripotentes dentro da construção de fibra, são afectadas pela aplicação directa de resistência mecânica para a construção de fibra durante a

geração de tecido. Esta descoberta facultava novas perspectivas importantes na relação entre tensão mecânica, bioquímica e métodos de imobilização de células e diferenciação de células, e tem aplicações na produção de uma ampla variedade de ligamentos, tendões e tecidos *in vitro* de células pluripotentes.

Uma construção de fibras que compreende as fibras de seda com uma geometria cablada é ilustrada nas Figs. 2C e 2D. A construção de fibras compreende uma hierarquia nos termos da forma que as fibras são agrupadas em paralelo e torcidas, e como o grupo resultante é agrupado e torcido, etc., ao longo de uma pluralidade de níveis na hierarquia, como melhor explicado mais adiante. As fibras de seda são inicialmente esticadas em uso paralelo, por exemplo, um suporte contendo grampos com molas que servem como apoios para as fibras. O suporte pode ser imerso na solução de extracção de sericina de modo a que os grampos possam manter uma tensão constante nas fibras através da extracção, enxaguamento e secagem.

A solução de extracção pode ser uma solução detergente alcalina ou detergente, e é mantida a cerca de 90 °C. O suporte é imerso na solução durante um período de tempo (por ex., em pelo menos 0,5 a 1 hora, dependendo do fluxo da solução e condições de mistura) que é suficiente para remover toda (+/- 0,4% remanescente, por peso) ou substancialmente quase toda a sericina (permitindo um possível resíduo) das fibras. Após a extracção, o suporte é removido de uma solução e as fibras são enxaguadas e secas. As máquinas de torção controladas por computador, cada uma das quais dispõe as fibras ou construções de fibras num perímetro de um disco e roda o disco num eixo central para torcer as fibras (isto é, cablagem) ou construções de fibras torcidas umas nas outras, de acordo com processos padrão

usados na indústria têxtil; no entanto, uma taxa de inclinação maior para as torções (por ex., entre cerca de 0 e cerca de 11,8 torções por cm) do que é normalmente produzida nos fios tradicionais. A taxa de cablagem ou torção, contudo, não deve ser tão alta de forma a causar a deformação plástica das fibras como resultado de uma tensão do balão criada à medida que o fio é libertado do carretel de alimentação antes da torção ou cablagem.

A extracção pode ser executada em qualquer nível da construção desde que a solução possa penetrar na construção para remover a sericina de todas as fibras. Acredita-se que o limite superior para o número de fibras numa disposição compacta, que pode ainda ser completamente permeada com a solução, é cerca de 20-50 fibras.

No entanto, claro, aquelas fibras podem ser dispostas como um grupo de 20 fibras paralelas ou, por exemplo, como 4 grupos de 5 fibras paralelas, em que os grupos podem ser torcidos, ou mesmo uma construção que compreende um nível ainda elevado tal como 2 conjuntos de 2 grupos de 5 fibras, em que os grupos e conjuntos podem ser torcidos. Aumentando o número de níveis hierárquicos na estrutura pode também aumentar o espaço vazio, deste modo aumentando potencialmente o número máximo de fibras das quais a sericina pode ser totalmente extraída de 20 a 50 fibras.

Porque a sericina, em alguns casos, é removida da construção após as fibras serem agrupadas ou após ter sido formada uma construção de nível superior, não há necessidade de aplicar cera ou qualquer outro tipo de revestimento mecanicamente protector nas fibras ou no sentido de também formar uma barreira para evitar contacto com a sericina nas fibras; e a construção pode ser livre de revestimentos (particularmente

sendo livre de revestimentos que não são totalmente degradados pelo corpo ou que causem uma resposta inflamatória).

Como descrito nos exemplos em baixo, as propriedades mecânicas da fibroína de seda (como ilustrado nas Figs. 1A, 1B e 1C) foram caracterizadas, e foram derivadas geometrias para formar matrizes aplicáveis para a criação de ACL através de engenharia usando um modelo computacional teórico (ver Fig. 1D). Uma construção de seis cordas foi escolhida para uso como uma substituição ACL para aumentar a área de superfície da matriz e para melhorar o suporte para crescimento do tecido. Duas hierarquias geométricas de construção para reparação de ACL compreendem o seguinte:

Matriz 1: 1 fio ACL = 6 cordas paralelas; 1 corda = 3 filamentos torcidos (3 torções/cm); 1 filamento = 6 conjuntos torcidos (3 torções/cm); 1 conjunto = 30 fibras lavadas paralelas; e

Matriz 2: 1 fio ACL = 6 cordas paralelas; 1 corda = 3 filamentos torcidos (2 torções/cm); 1 filamento = 3 conjuntos torcidos (2,5 torções/cm); 1 conjunto = 3 grupos (3 torções/cm); 1 grupo = 15 fibras de fibroína de seda extraídas paralelas.

O número de fibras e geometrias para a Matriz 1 e Matriz 2 foi seleccionado de tal forma que as próteses de seda são semelhantes às propriedades biomecânicas de ACL na resistência à tracção, rigidez linear, limite de elasticidade e % de alongamento na falha, servindo como um ponto de partida sólido para o desenvolvimento de um ACL de tecido gerado através de engenharia. Os efeitos do número crescente de fibras, número de níveis e quantidade de torções em cada uma dessas propriedades biomecânicas são

mostrados na Tabela 8 e Tabelas 6 e 7, respectivamente.

A capacidade de gerar duas matrizes com geometrias diferentes, ambas resultando em propriedades mecânicas que imitam propriedades do ACL, indica que uma ampla variedade de configurações geométricas existe para atingir as propriedades mecânicas desejadas. As geometrias alternativas para qualquer ligamento desejado ou tecido do tendão podem compreender qualquer número, combinação ou organização de cordas, filamentos, conjuntos, grupos e fibras (ver Tabela 10, em baixo) que resulta numa construção de fibra com propriedades mecânicas aplicáveis que imitam aquelas do ligamento ou tendão desejado. Por exemplo, uma (1) prótese ACL pode ter qualquer número de cordas em paralelo desde que exista um meio para ancoragem da construção da fibra final *in vitro* ou *in vivo*. Também, vários números de níveis de torção (onde um único nível é definido como um grupo, conjunto, filamento ou corda) para uma dada geometria podem ser usados desde que a construção da fibra resulte nas propriedades mecânicas desejadas. Além disso, existe um grande grau de liberdade na concepção da geometria da construção de fibra e organização no fabrico de uma prótese ACL; deste modo, o modelo computacional teórico desenvolvido pode ser usado para prever o *design* da construção de fibra de um ligamento desejado ou tecido de tendão (ver por exemplo, em baixo). Por exemplo, quando vários conjuntos de matrizes mais pequenas são pretendidos (por ex., 36 fibras no total) com apenas dois níveis de hierarquia para promover o crescimento, uma TPI de 8-11 ou ~3-4 torções por cm é necessária e pode ser prevista por um modelo sem a necessidade de trabalho empírico.

Consequentemente, uma variação em geometria (isto é, o número de cordas usado para criar uma prótese ou o número de

fibras num grupo) pode ser usada para gerar matrizes aplicáveis à maioria dos ligamentos e tendões. Por exemplo, para ligamento e tendões mais pequenos da mão, a geometria e organização usadas para gerar uma única corda da Matriz 1 (ou duas cordas ou três cordas, etc.) podem ser adequadas dado que a organização da construção da fibra resulta em propriedades mecânicas adequadas para o ambiente fisiológico particular. Especificamente, para acomodar um ligamento ou tendão mais pequeno comparado à Matriz 1 ou Matriz 2, menos fibras por nível serão usadas para gerar conjuntos ou filamentos mais pequenos. Vários conjuntos podem então ser usados em paralelo. No caso de um ligamento maior, tal como o ACL, pode ser desejável ter conjuntos mais pequenos torcidos em TPI mais elevadas, para reduzir a rigidez e promover o crescimento, do que ter poucos conjuntos maiores onde o crescimento não pode ocorrer, limitando deste modo a degradação da matriz.

Contudo, a invenção não é limitada com respeito à geometria do cabo como descrito, e qualquer geometria ou combinação de geometrias (por ex., paralela, torcida, entrelaçada, tipo rede) pode ser usada, que resulte em propriedades mecânicas da construção da fibra similares ao ACL (isto é, maior que 2000 N de resistência à tracção, entre 100-600 N/mm de rigidez linear para um ACL nativo ou enxerto de substituição comumente usado, tal como o tendão patelar, com o comprimento entre 26-30 mm) ou para o ligamento ou tendão desejado que deve ser produzido. O número de fibras e a geometria da Matriz 1 e Matriz 2 foi seleccionado para gerar matrizes ACL mecanicamente adequadas, ou outras matrizes do ligamento ou tendão desejadas [por ex., ligamento cruzado posterior (PCL)]. Por exemplo, uma única corda da construção da Matriz 1 de seis cordas foi usada para reconstruir o ligamento colateral médio (MCL) num coelho (ver Fig. 15A e

Fig. 15B). As propriedades mecânicas das construções de seis cordas de seda da Matriz 1 e Matriz 2 são descritas na Tabela 10 e nas Figs. 3A-3D, como ainda descrito no exemplo, em baixo. As geometrias adicionais e suas propriedades mecânicas relacionadas estão listadas na Tabela 11 como um exemplo do grande grau de liberdade de *design* que resultaria numa construção de fibra aplicável no tecido ACL fabricado de acordo com métodos aqui descritos.

Vantajosamente, a construção de fibra com base em fibra de seda pode consistir apenas de seda. Os tipos e fontes de seda incluem os seguintes: sedas de bichos-da-seda, tais como *Bombyx mori* e espécies relacionadas; sedas de aranhas, tal como *Nephila clavipes*; sedas de bactérias geneticamente fabricadas, células mamíferas, levedura, células de insectos, e plantas e animais transgênicos; sedas obtidas a partir de células cultivadas de bichos-da-seda ou aranhas; sedas nativas; sequências totais ou parciais clonadas de sedas nativas; e sedas obtidas a partir de genes sintéticos que codificam sequências de seda ou tipo seda. Na sua forma pura, as fibras de fibroína de seda nativa dos bichos-da-seda *Bombyx mori* são revestidas com uma proteína tipo cola chamada sericina, a qual é extraída, completamente ou quase completamente das fibras, antes das fibras que constituem a construção da fibra serem inoculadas com células.

A construção de fibras pode compreender um composto de: (1) fibras de seda e colagénio; (2) espumas de seda e colagénio, malhas, ou esponjas; (3) fibras de fibroína de seda e espumas de seda, malhas, ou esponjas; (4) polímeros de seda e biodegradáveis [por ex., celulose, algodão, gelatina, polilactida, poliglicólico, poli(lactídeo-co-glicolídeo), policaprolactona, poliamidas, polianidridos, poliaminoácidos, poli (orto éster), poliacetais, proteínas,

poliuretanos degradáveis, polissacarídeos, policianoacrilatos, glicosaminoglicanos (por ex., condroitinossulfúrico, heparina, etc.), polissacarídeos (nativos, reprocessados ou versões geneticamente fabricadas: por ex., ácido hialurónico, alginatos, xantanos, pectina, quitosano, quitina, e similares), elastina (nativa, reprocessada ou versões geneticamente fabricadas e químicas), e colagénios (nativos, reprocessados ou versões geneticamente fabricadas e químicas], ou (5) polímeros de seda e não biodegradáveis (por ex., poliamida, poliéster, poliestireno, polipropileno, poliacrilato, polivinil, policarbonato, politetrafluoretileno, ou material nitrocelulose. O composto aumenta geralmente as propriedades de construção da fibra tais como as porosidades, degradabilidade e também melhora a inoculação, proliferação, diferenciação da célula ou desenvolvimento do tecido. As Figs. 16A, 16B e 16C ilustram a capacidade de fibras de colagénio para suportar o crescimento das BMSC e diferenciação específica do ligamento.

A construção da fibra pode também ser tratada para melhorar a proliferação da célula e/ou diferenciação do tecido aí. Os tratamentos de construção de fibra exemplares para melhorar a proliferação da célula e diferenciação do tecido incluem, mas não são limitados a, metais, irradiação, reticulação, modificações químicas na superfície [por ex., revestimento do péptido RGD (arg-gly-asg), revestimento de fibronectina, união de factores de crescimento], e modificações físicas da superfície.

Um segundo aspecto desta descrição relaciona-se com um ACL, mecânica e biologicamente funcional, formado a partir de uma nova construção de fibra com base em fibra de seda e (dependendo do destinatário do tecido) células estromais da

medula óssea (BMSC) autólogas ou alogénicas inoculadas na construção da seda. A construção da fibra com base em fibra de seda induz diferenciação das células estromais face à linhagem do ligamento sem a necessidade de qualquer estimulação mecânica durante a cultura do reactor biológico. As BMSC inoculadas na construção de fibra com base em fibra de seda e cultivadas numa placa de petri começaram a fixar e difundir (ver Figs. 7A-D); as células proliferam para cobrir a construção da fibra (ver Figs. 8A-B, Fig. 9A e Fig. 9B) e diferenciam, como mostrado pela expressão dos marcadores específicos do ligamento (ver Fig. 14). Os marcadores para cartilagem (colagénio tipo II) e para osso (sialoproteína óssea) não foram expressos (ver a Fig. 14). Os dados que ilustram a expressão de marcadores específicos de ligamento são indicados num exemplo, em baixo.

Outro aspecto desta descrição relaciona-se com um método para produzir um ACL *ex vivo*. As células capazes de diferenciar nas células de ligamento são cultivadas sob condições que estimulam os movimentos e forças experienciadas por um ACL *in vivo* através do curso de desenvolvimento embrionário até à função do ligamento maturo. Especificamente, sob condições estéreis, as células pluripotentes são inoculadas dentro da construção de fibra com base em fibra da seda tridimensional na qual as células podem aderir e a qual é vantajosamente de forma cilíndrica. A construção de fibra com base em fibra da seda tridimensional usada no método serve como uma construção de fibra preliminar, a qual é suplementada e possivelmente mesmo substituída por componentes de construção de fibra extracelular, produzida pelas células de diferenciação. O uso da construção de fibra com base em fibra de seda pode melhorar ou acelerar o desenvolvimento do ACL. Por exemplo,

a nova construção de fibra com base em fibra de seda pode ser concebida para possuir as propriedades mecânicas específicas (por ex., resistência à tracção aumentada) para que possa suportar fortes resistências antes de reforçar os componentes de construção de fibra (por ex., colagénio e tenascina extracelulares). Outras propriedades vantajosas da nova construção de fibra preliminar com base em fibra da seda incluem, sem limitação, biocompatibilidade e susceptibilidade para biodegradação.

As células pluripotentes podem ser inoculadas dentro da construção da fibra preliminar pré- ou pós-formação da construção da fibra, dependendo da construção de fibra particular usada e durante o método da formação de construção da fibra. Normalmente, é preferida a inoculação uniforme. Na teoria, o número de células inoculadas não limita o ligamento final produzido; contudo, a inoculação óptima pode aumentar a taxa de geração. As quantidades de inoculação óptimas vão depender das condições de cultura específica. A construção de fibra pode ser inoculada com desde cerca de 0,05 a 5 vezes a densidade da célula fisiológica de um ligamento nativo.

Um ou mais tipos de células pluripotentes são usados no método. Tais células têm a capacidade de diferenciar na ampla variedade de tipos de células em resposta aos sinais de diferenciação adequados e para expressar (marcadores específicos de ligamento). Mais especificamente, o método usa células, tais como células estromais da medula óssea, que têm a capacidade para diferenciar nas células do tecido do ligamento e tendão. Se o ligamento fabricado por bioengenharia resultante for transplantado num paciente, as células devem ser derivadas de uma fonte que é compatível com o destinatário pretendido. Apesar de o destinatário ser

geralmente um humano, também existem aplicações na medicina veterinária. As células podem ser obtidas a partir do destinatário (autólogas), apesar de também poderem ser utilizadas células do dador compatível para criar os ligamentos alogénicos. Por exemplo, ao criar os ligamentos alogénicos (por ex., usando células de outro humano, tais como células estromais da medula óssea isoladas da medula óssea doada, ou fibroblastos de ACL isolados do tecido ACL doado), as células fibroblásticas do ligamento cruzado anterior isoladas do tecido ACL dador intacto (por ex., cadavéricas ou de transplantes totais do joelho), tecido ACL com ruptura (por ex., colhido no momento da cirurgia de um paciente que vai ser submetido à reconstrução do ACL) ou podem ser usadas células estromais da medula óssea. A determinação da compatibilidade está inserida nos meios do interveniente especialista.

Os ligamentos ou tendões incluindo, mas não limitado a, ligamento cruzado posterior, tendões do manguito rotador, ligamento colateral posterior do cotovelo e joelho, tendões flexores da mão, ligamentos laterais do tornozelo e tendões e ligamentos da mandíbula ou articulação temporomandibular que não ACL, cartilagem, osso ou outros tecidos podem ser criados com a construção da fibra de acordo com os métodos desta descrição. Desta forma, as células a serem inoculadas na construção da fibra são seleccionadas de acordo com o tecido a ser produzido (por ex., pluripotente ou do tipo de tecido desejado). As células inoculadas na construção da fibra, como aqui descrito, podem ser autólogas ou alogénicas. O uso de células autólogas cria efectivamente um aloenxerto ou autoenxerto para implantação num destinatário.

Como indicado, para formar um ACL, células, tais como células estromais da medula óssea, são inoculadas na

construção da fibra. As células estromais da medula óssea são um tipo de célula pluripotente e são também referidas, na técnica, como células estaminais mesenquimais ou apenas como células estromais. Como indicado, a fonte dessas células pode ser autóloga ou alogénica. Adicionalmente, células pluripotentes ou estaminais, embriónicas ou adultas podem ser usadas se o ambiente adequado (*in vivo* ou *in vitro*), inoculadas na construção de fibra com base em fibra de seda, poder recapitular um ACL ou qualquer outro ligamento ou tecido desejado numa composição de construção de fibra extracelular (por ex., proteína, conteúdo de glicoproteína), organização, estrutura ou função.

As células fibroblásticas podem também ser inoculadas na construção de fibra inventiva. Uma vez que as células fibroblásticas não são referidas muitas vezes como células pluripotentes, os fibroblastos pretendem incluir fibroblastos ACL humano maduros (autólogos ou alogénicos) isolados do tecido ACL, fibroblastos do outro tecido do ligamento, fibroblastos do tecido do tendão, do prepúcio neonatal, do sangue do cordão umbilical, ou de qualquer outra célula, madura ou pluripotente, madura desdiferenciada, ou geneticamente criada, de tal forma que quando cultivada num ambiente adequado (*in vivo* ou *in vitro*), e inoculada na construção de fibra com base em fibra de seda, pode recapitular um ACL ou qualquer outro ligamento desejado ou tecido na composição da construção de fibra extracelular (por ex., proteína, conteúdo de glicoproteína), organização, estrutura ou função.

As faces do cilindro de construção de fibra são cada uma delas fixa em apoios, através dos quais um intervalo de forças deve ser aplicado à construção da fibra. Para facilitar a administração da força à construção da fibra,

toda a superfície de cada face respectiva da construção da fibra pode estar em contacto com a face dos apoios respectivos. Os apoios com uma forma que reflecte o local da fixação (por ex., cilíndrico) são melhor adequados para uso neste método. Uma vez reunidas, as células na construção de fibra ancorada são cultivadas sob condições adequadas para crescimento e regeneração da célula. A construção da fibra é sujeita a uma ou mais forças mecânicas aplicadas através de apoios fixos (por ex., via movimento de um ou ambos os apoios fixos) durante o decorrer da cultura. As forças mecânicas são aplicadas durante o período de cultura para imitar condições experimentadas por um ACL nativo ou outros tecidos *in vivo*.

Os apoios devem ser compostos por um material adequado para fixação da construção de fibra, e a fixação resultante deve ser forte o suficiente para suportar a tensão das forças mecânicas aplicadas. Adicionalmente, os apoios podem ser de um material que é adequado para a fixação da construção da fibra extracelular que é produzida pelas células diferenciadoras. Os apoios suportam o crescimento do tecido ósseo (*in vitro* ou *in vivo*) ao mesmo tempo que suportam o ligamento em desenvolvimento. Alguns exemplos de material de apoio adequado incluem, sem limitação, hidroxiapatite, coral Goinopra, osso desmineralizado, osso (alógeno ou autógeno). Os materiais de apoio podem também incluir titânio, aço inoxidável, polietileno de alta densidade, DACRON e TEFLON.

Alternativamente, o material de apoio pode ser criado ou ainda melhorado por infusão de um material seleccionado com um factor que promove uma união da construção de fibra de ligamento ou união da construção de fibra de osso ou ambos. O termo "infundir" considera incluir qualquer método de

aplicação que distribui adequadamente o factor no apoio (por ex., revestir, permear, contactar). Os exemplos de tais factores incluem sem limitação, laminina, fibronectina, qualquer proteína de construção de fibra extracelular que promova adesão, seda, factores que contêm regiões de união de péptido arginina-glicina-aspartato (RGD) ou os próprios péptidos RGD. Os factores de crescimento ou proteína morfogénica de osso podem também ser usados para melhorar a fixação do apoio. Adicionalmente, os apoios podem ser pré-inoculados com células (por ex., células estaminais, células de ligamento, osteoblastos, células progenitoras osteogénicas) que aderem aos apoios e unem a construção da fibra, para produzir uma ligação de construção da fibra melhorada *in vitro* e *in vivo*.

Um sistema de apoio exemplar é descrito no pedido co-pendente do requerente U.S.S.N. 09/950,561. A construção da fibra é fixa aos apoios através do contacto com a face do apoio ou alternativamente por penetração actual do material de construção da fibra através do material de apoio. Porque a força aplicada à construção da fibra através dos apoios dita o ligamento final produzido, o tamanho do ligamento final produzido é, em parte, ditado pelo tamanho do local de fixação do apoio. Um apoio de tamanho adequado para o ligamento final desejado deve ser usado. Um exemplo de uma forma de apoio para a formação de um ACL é um cilindro. Contudo, outras formas e tamanhos de apoio também vão funcionar de forma adequada. Por exemplo, os apoios podem ter um tamanho e composição adequados para inserção directa nos túneis do osso no fémur e tíbia de um destinatário do ligamento obtido por bioengenharia.

Alternativamente, os apoios podem ser usados apenas

temporariamente durante a cultura *in vitro*, e de seguida, removidos apenas quando a construção da fibra é implantada *in vivo*.

Ainda, a nova construção da fibra com base em fibra de seda pode ser inoculada com BMSC e cultivada num reactor biológico. Dois tipos de ambientes de crescimento que existem actualmente podem ser usados de acordo com métodos desta descrição: (1) o sistema do dispositivo reactor biológico *in vitro*, e (2) a articulação do joelho *in vivo*, que serve como um "reactor biológico" à medida que providencia o ambiente fisiológico incluindo as células progenitoras e estímulos (químicos e físicos) necessários para o desenvolvimento de um ACL viável resultando numa construção de fibra com propriedades mecânicas e biocompatíveis adequadas. O dispositivo reactor biológico providencia condições de cultura óptimas para a formação de um ligamento em termos de diferenciação e produção de construção de fibra extracelular (ECM), e o qual providencia assim o ligamento com propriedades mecânicas e biológicas óptimas antes da implantação num destinatário. Adicionalmente, quando a construção de fibra com base em fibra de seda é inoculada e cultivada com células *in vitro*, uma placa petri pode ser considerada ser o reactor biológico dentro do qual existem condições adequadas para o crescimento de célula e regeneração, isto é, um ambiente estático.

As células podem também ser cultivadas na construção da fibra sem a aplicação de quaisquer forças mecânicas, isto é, num ambiente estático. Por exemplo, a construção da fibra apenas com base em fibra de seda, sem estimulação ou forças mecânicas aplicadas *in vitro*, quando inoculada e cultivada com BMSC, induz as células a proliferar e expressar os

marcadores específicos do ligamento e tendão (ver os exemplos aqui descritos). A articulação do joelho pode servir como crescimento fisiológico e ambiente de desenvolvimento que pode providenciar as células e os sinais ambientais correctos (químicos e físicos) para a construção da fibra, de tal forma que se desenvolve tecnicamente um ACL. Deste modo, a articulação do joelho (como a sua própria forma de reactor biológico) mais a construção da fibra (não inoculada, inoculada e não diferenciada *in vitro*, ou inoculada e diferenciada *in vitro* antes da implantação) vai resultar no desenvolvimento de um ACL, ou outro tecido desejado dependendo do tipo de célula inoculada na construção da fibra e a localização anatómica de implantação da construção da fibra. A Fig. 15 A-B ilustra os efeitos do ambiente da articulação de joelho colateral médio no desenvolvimento do ligamento colateral médio (MCL) apenas quando uma construção de fibra com base em fibra de seda, não inoculada com propriedades mecânicas MCL adequadas, é implantada durante 6 semanas *in vivo*. Se as células são cultivadas num ambiente estático sem estimulação mecânica aplicada, ou num ambiente dinâmico, tal como num dispositivo rector biológico, as condições adequadas para o crescimento e regeneração da célula estão vantajosamente presentes no fabrico do ligamento ou tecido desejado.

Nas experiências descritas nos exemplos, em baixo, a estimulação mecânica aplicada mostrou influenciar a morfologia e organização celular das células progenitoras dentro do tecido resultante. Os componentes segregados da construção da fibra extracelular pelas células e organização da construção da fibra extracelular ao longo do tecido foram também significativamente influenciados pelas forças aplicadas à construção da fibra durante a geração de tecido. Durante a geração de tecido *in vitro*, as células e

construção da fibra extracelular são alinhadas ao longo do eixo da carga, reflectindo a organização *in vivo* de um ACL nativo que se encontra também ao longo de vários eixos de carga produzidos por movimento e função natural da articulação do joelho. Estes resultados sugerem que o estímulo físico experienciado na natureza pelas células de tecido em desenvolvimento, tal como o ACL, têm um papel significativo na diferenciação das células progenitoras e formação de tecido. Indicam ainda que este papel pode ser efectivamente duplicado *in vitro* através de manipulação mecânica para produzir tecido semelhante. Quanto mais idênticas forem as forças produzidas por manipulação mecânica das forças experienciadas por um ACL *in vivo*, mais idêntico será o tecido resultante com um ACL nativo.

Quando é aplicada estimulação mecânica *in vitro* à construção da fibra através de um reactor biológico, existe independência mas controlo concorrente ao longo de forças de rotação e cíclicas como aplicadas a um apoio relativamente ao outro apoio. Alternativamente, a construção da fibra pode ser implantada *in vivo*, inoculada com células ACL do paciente e expostas *in vivo* à sinalização mecânica através do paciente.

Quando a construção da fibra for inoculada com células antes da implantação, as células são cultivadas dentro da construção da fibra sob condições adequadas para o crescimento celular e diferenciação. Durante o processo de cultivo, a construção da fibra pode ser sujeita a uma ou mais forças mecânicas através do movimento de uma ou ambos os apoios anexos. As forças mecânicas de tensão, compressão, torção e corte, e combinação das mesmas, são aplicadas nas combinações, magnitudes e frequências adequadas para imitar o estímulo mecânico experienciado por

um ACL *in vivo*.

Vários factores terão influência na quantidade de força que pode ser tolerada pela construção da fibra (por exemplo, composição e densidade celular da construção da fibra). Espera-se que a resistência da construção da fibra altere ao longo do curso do desenvolvimento de tecido. Assim, as forças ou esforços mecânicos irão aumentar, diminuir ou permanecer constantes em magnitude, duração, frequência e variedade ao longo do período de geração de ligamento, para corresponder adequadamente à força da construção da fibra aquando da aplicação.

Ao produzir um ACL, quanto mais exacta for a intensidade e combinação do estímulo aplicado à construção da fibra durante o desenvolvimento do tecido, mais o ligamento será parecido com um ACL nativo. Os dois tecidos devem ser considerados relativamente à função natural do ACL ao conceber o regime de força *in vitro* que imita o ambiente *in vivo*: (1) os diferentes tipos de movimento experienciados pelo ACL e as respostas do ACL aos movimentos da articulação do joelho, e (2) a extensão das tensões mecânicas que o ligamento está sujeito. São geradas combinações específicas de estímulos mecânicos a partir de movimentos naturais da estrutura do joelho e transmitidos ao ACL nativo.

Para descrever, resumidamente, os movimentos do joelho, a ligação da tíbia e fémur pelo ACL providencia seis graus de liberdade quando se considera os movimentos de dois ossos relativamente um ao outro. A tíbia pode mover-se em três direcções e pode rodar relativamente aos eixos para cada uma dessas três direcções. O joelho é impedido de conseguir a amplitude total destes seis graus de liberdade devido à

presença de ligamentos e fibras capilares e às superfícies do joelho (Biden et al., "Experimental Methods Used to Evaluate Knee Ligament Function," Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, Ed. D. Daniel et al., Raven Press, pp. 135-151, 1990). Também são possíveis pequenos movimentos de translação. Os locais de anexo do ACL são responsáveis pela sua função de estabilização na articulação do joelho. O ACL funciona como um estabilizador primário da translação anterior tibial, e como um estabilizador secundário da angulação *valgus-varus*, e rotação tibial (Shoemaker et al., "The Limits of Knee Motion," Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, Ed. D. Daniel et al., Raven Press, pp. 1534-161, 1990). Assim, o ACL é responsável por estabilizar o joelho em três dos seis possíveis graus de liberdade. Como resultado, o ACL desenvolveu uma organização de fibra específica e estrutura geral para realizar estas funções de estabilização. Estas condições são estimuladas *in vitro* para produzir um tecido com estrutura similar e organização em fibra.

A extensão das tensões mecânicas experienciadas pelo ACL pode ser igualmente resumida. O ACL sofre cargas cíclicas de cerca de 400 N entre um ou dois milhões de ciclos por ano (Chen et al., J. Biomed. Mat. Res. 14:567-586, 1980).

Também considerada é a rigidez linear (~182 N/mm), deformação final (100% do ACL) e energia absorvida na falha (12,8 N-m) (Woo et al., The tensile properties of human anterior cruciate ligament (ACL) and ACL graft tissues, Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, Ed. D. Daniel et al. Raven Press, pp. 279-289, 1990) ao desenvolver um substituto cirúrgico do ACL.

A secção dos exemplos, em baixo, pormenoriza a produção de um protótipo de bioengenharia do ligamento cruzado anterior (ACL) *ex vivo*. Forças mecânicas que imitam um subconjunto de estímulos mecânicos experienciados por um ACL nativo *in vivo* (deformação rotacional e deformação linear) foram aplicadas em combinação, e o ligamento resultante que foi formado foi estudado para determinar os efeitos das forças aplicadas no desenvolvimento do tecido. A exposição do ligamento em desenvolvimento à carga fisiológica durante a formação *in vitro* induziu as células a adoptar uma orientação definida ao longo dos eixos de carga, e para gerar também matrizes extracelulares ao longo dos eixos. Estes resultados indicam que a incorporação de forças mecânicas multidimensionais complexas no regime, para produzir uma rede mais complexa de eixos de carga que imitam o ambiente do ACL nativo, irá produzir um ligamento criado por bioengenharia que se parece mais com um ACL nativo.

As diferentes forças mecânicas que podem ser aplicadas incluem, sem limitação, tensão, compressão, torção e corte. Estas forças são aplicadas em combinações que simulam as forças experienciadas por um ACL no curso dos movimentos e função natural da articulação do joelho.

Estes movimentos incluem, sem limitação, extensão e flexão da articulação do joelho como definido nos planos coronal e sagital, e flexão da articulação do joelho. De forma óptima, a combinação de forças aplicadas imitam o estímulo mecânico experienciado por um ligamento cruzado anterior *in vivo* de forma tão precisa quanto experimentalmente possível. Variando o regime específico da aplicação da força através do curso da geração de ligamento é esperado influenciar a taxa e resultado do desenvolvimento de tecido, com condições

óptimas a serem determinadas empiricamente. Variáveis potenciais no regime incluem, sem limitação: (1) taxa de esforço, (2) percentagem de esforço, (3) tipo de esforço (por exemplo, transladação e rotação), (4) frequência, (5) número de ciclos num dado regime, (6) número de diferentes regimes, (7) duração em pontos extremos da deformação do ligamento, (8) níveis de força e (9) combinação de força diferentes. Existe uma grande variedade de variações. O regime de forças mecânicas aplicadas pode produzir fibras organizadas helicoidalmente, similares àsquelas do ligamento nativo, descrito em baixo.

Os conjuntos de fibras de um ligamento nativo são dispostos numa organização helicoidal. O modo de ligação e a necessidade para a rotação do joelho que roda $\sim 140^\circ$ de flexão resultou no facto de o ACL nativo herdar uma torção de 90° e com os conjuntos de fibras periféricas a desenvolver uma organização helicoidal. Esta característica biomecânica única permite que o ACL suporte cargas extremamente elevadas. No ACL funcional, esta organização helicoidal das fibras permite que fibras anterior-posterior e posterior-anterior permaneçam relativamente isométricas relativamente umas às outras para todos os graus de flexão; assim, a carga pode ser igualmente distribuída a todos os conjuntos de fibras em qualquer grau de flexão da articulação do joelho, estabilizando o joelho em todos os intervalos de movimento da articulação. As forças mecânicas que estimulam uma combinação de flexão de articulação do joelho e extensão da articulação do joelho podem ser aplicadas ao ligamento em desenvolvimento para produzir um ACL criado que possui esta mesma organização helicoidal. O dispositivo mecânico utilizado nas experiências apresentadas nos exemplos, em baixo, providencia controlo sobre as taxas de esforço e sobreesforço (ambas translacionais e

rotacionais). O dispositivo mecânico irá monitorizar a carga actual nos ligamentos em crescimento, servindo para "ensinar" os ligamentos, ao longo do tempo, através da monitorização e ao aumentar os regimes de carga.

Outro aspecto desta descrição relaciona-se com o ligamento cruzado anterior criado por bioengenharia, produzido pelos métodos acima descritos. O ligamento criado por bioengenharia produzido por estes métodos é caracterizado pela orientação celular e/ou um padrão de crimpagem da construção da fibra na direcção das forças mecânicas aplicadas durante a geração. O ligamento é também caracterizado pela produção/presença de componentes de construção da fibra extracelular (por exemplo, colagénio tipo I e tipo III, fibronectina, e proteínas tenascina-C) ao longo do eixo de carga mecânica experienciada durante a cultura. Os conjuntos de fibras do ligamento podem ser dispostos numa organização helicoidal, como debatido acima.

Os métodos acima que usam a construção da fibra com base numa nova fibra de seda não são limitados à produção de um ACL, mas podem também ser usados para produzir outros ligamentos e tendões encontrados no joelho (por exemplo, ligamento cruzado anterior) ou outras partes do corpo (por exemplo, mão, pulso, tornozelo, cotovelo, mandíbula e ombro), tal como por exemplo, mas não limitado ao ligamento cruzado posterior, tendões do manguito rotador, ligamento colateral médio do cotovelo e joelho, tendões flexores da mão, ligamentos laterais do tornozelo e tendões e ligamentos da mandíbula ou articulação temporomandibular. Todas as articulações móveis num corpo humano têm ligamentos especializados que ligam a extremidades articulares dos ossos na articulação. Cada ligamento no corpo tem uma estrutura específica e organização que é ditada pela sua

função e ambiente. Os vários ligamentos do corpo, as suas localizações e funções são listados em *Anatomy, Descriptive and Surgical* (Gray, H., Eds. Pick, T. P., Howden, R., Bounty Books, New York, 1977. Ao determinar os estímulos físicos experienciados por um ligamento ou tendão, e incorporando forças que imitam estes estímulos, o método acima mencionado para produzir um ACL *ex vivo* pode ser adaptado para produzir ligamentos e tendões criados por bioengenharia *ex vivo* que simulam qualquer ligamento e tendão no corpo.

O tipo específico de ligamento ou tendão a ser produzido é predeterminado antes da geração de tecido uma vez que vários aspectos do método variam com as condições específicas experienciadas *in vivo* pelo ligamento ou tendão nativo. As forças mecânicas às quais o ligamento ou tendão em desenvolvimento são sujeitas durante a cultura de células são determinadas pelo ligamento ou tendão particular a serem cultivados. As condições específicas podem ser determinadas ao estudar o ligamento ou tendão nativo e o seu ambiente e função. Uma ou mais forças mecânicas experienciadas pelo ligamento ou tendão *in vivo* são aplicadas à construção da fibra durante a cultura de células na construção da fibra. O médico com experiência irá reconhecer que um tendão e ligamento que são superiores àqueles actualmente disponíveis podem ser produzidos pela aplicação de um subconjunto de forças experienciadas pelo ligamento e tendão nativos. Contudo, optimamente, o intervalo total de forças *in vivo* será aplicado à construção de fibra nas magnitudes e combinações adequadas para produzir um produto final que se parece muito com o ligamento ou tendão nativos. Estas forças incluem, sem limitação, as forças descritas acima para a produção de um ACL. Devido ao facto de as forças mecânicas aplicadas variarem com o tipo de ligamento ou tendão, a dimensão final do ligamento ou tendão será

influenciada pelos apoios usados, composição óptima do apoio, a dimensão e locais de ligação da construção serão determinados para cada tipo de ligamento ou tendão pelo médico com experiência. Os tipos de células cultivadas na construção de fibra são obviamente determinados com base no tipo de ligamento ou tendão a ser produzido.

Outros tipos de tecido podem ser produzidos *ex vivo* usando métodos semelhantes àqueles descritos acima para a geração de ligamentos ou tendões *ex vivo*. Os métodos acima descritos podem também ser aplicados para produzir uma gama de produtos de tecido através de engenharia que envolvam deformação mecânica como uma grande parte da sua função, tal como músculo (por exemplo, músculo liso, músculo esquelético, músculo cardíaco), osso, cartilagem, discos vertebrais e alguns tipos de vasos sanguíneos. As células estromais da medula óssea possuem a capacidade de se diferenciar nestas, bem como em outros tecidos. A geometria da construção de fibra com base em seda, ou construção de fibra compósito, pode ser facilmente adaptada à configuração geométrica anatómica do tipo de tecido desejado. Por exemplo, as fibras de fibroína de seda podem ser reformadas num tubo cilíndrico para recriar artérias.

Os resultados apresentados nos exemplos, em baixo, indicam que o crescimento num ambiente que imita o ambiente mecânico específico de um dado tecido irá induzir a diferenciação celular adequada para produzir um tecido através de bioengenharia que se parece, significativamente, com o tecido nativo. Os intervalos e tipos de deformação mecânica da construção de fibra podem ser estendidos para produzir um amplo leque de organização estrutural de tecidos. O ambiente de cultivo celular pode reflectir o ambiente *in vivo* experienciado pelo tecido nativo e as células que contém,

através do curso de desenvolvimento embrionário até à função madura das células dentro do tecido nativo, tão preciso quanto possível. Os factores a considerar ao conceber condições de cultivo específicas para produzir um dado tecido incluem, sem limitação, a composição da construção de fibra, o método de imobilização celular, o método de ancoragem da construção de fibra ou tecido, as forças específicas aplicadas e o meio de cultura da célula. O regime específico de estimulação mecânica depende do tipo de tecido a ser produzido, e é estabelecido ao variar a aplicação de forças mecânicas (por exemplo, apenas tensão, apenas torção, combinação de tensão e torção com ou sem corte, etc.), a amplitude da força (por exemplo, ângulo ou elongação), a frequência e duração da aplicação, e a duração de períodos de estimulação e descanso.

O método para produzir o tipo de tecido específico *ex vivo* é uma adaptação do método acima descrito para produzir um ACL. Os componentes envolvidos incluem células pluripotentes, uma construção de fibra tridimensional na qual as células podem aderir, uma pluralidade de apoios que têm uma face adequada para a ligação da construção de fibra. As células pluripotentes (tais como células estromais de medula óssea) são semeadas na construção de fibra tridimensional através de meios para imobilizar de forma uniforme as células dentro da construção de fibra. O número de células semeadas também não é visto como limitador; contudo, semear a construção de fibra com células de alta densidade pode acelerar a geração de tecido.

As forças específicas aplicadas serão determinadas para cada tipo de tecido produzido através de exame de tecido nativo e estímulo mecânico experienciado *in vivo*. Um dado tipo de tecido experiencia forças características que são ditadas

por localização e função do tecido dentro do corpo. Por exemplo, é sabido que a cartilagem experiencia uma combinação de corte e compressão/tensão *in vivo*; o osso experiencia compressão.

Os estímulos adicionais (por exemplo, estímulos químicos, estímulos electromagnéticos) podem também ser incorporados nos métodos acima descritos para produzir ligamentos, tendões e outros tecidos através de bioengenharia. É sabido que a diferenciação celular pode ser influenciada por estímulos químicos do ambiente, habitualmente produzidos pelas células próximas, tal como crescimento segregado ou factores de diferenciação, contacto célula-célula, gradientes químicos e níveis de pH específicos, apenas para nomear alguns. Outros estímulos mais únicos são experienciados por tipos mais especializados de tecidos (por exemplo, a estimulação eléctrica do músculo cardíaco). Espera-se que a aplicação dos ditos estímulos específicos do tecido (por exemplo, 1-10 mg/ml de factor de crescimento transformante beta-1 (TGF- β 1) independentemente ou em conjunto com as forças mecânicas adequadas, facilite a diferenciação das células num tecido que se aproxima do tecido natural específico.

Os tecidos produzidos pelos métodos acima descritos providenciam um conjunto ilimitado de tecidos equivalentes para implantação cirúrgica num recipiente compatível, particularmente para substituição ou reparação de tecido danificado. Podem também ser utilizados tecidos criados através de engenharia para estudos *in vitro* de função de tecido patológico ou normal, por exemplo, para teste *in vitro* de células e respostas ao nível do tecido até manipulações genéticas, mecânicas ou moleculares. Por exemplo, os tecidos com base em células normais ou

transfectadas podem ser usados para avaliar as respostas de tecido aos estímulos bioquímicos ou mecânicos, identificar as funções de genes específicos ou produtos de genes que podem ser superexpressados ou removidos, ou para estudos dos efeitos de agentes farmacológicos. Os tais estudos irão, provavelmente, providenciar mais informação sobre o desenvolvimento do tendão e tecido, função normal e patológica e, eventualmente, levar até substituições de tecido criadas através de engenharia, baseadas, em parte, em abordagens de engenharia de tecido já estabelecidas, novas informações sobre diferenciação celular e desenvolvimento de tecido, e o uso de sinais reguladores mecânicos em conjunção com factores exógenos e derivados de células para melhorar as propriedades estruturais e funcionais do tecido.

A produção de tecidos através de engenharia, tal como ligamentos e tendões, tem também o potencial para aplicações, tais como colheita de células estromais de medula óssea de indivíduos com alto risco de ferimento de tecido (por exemplo, ruptura do ACL) antes do ferimento.

Estas células podem ser armazenadas até serem necessárias ou inoculadas na construção de fibra adequada e cultivadas e diferenciadas *in vitro* sob estímulos mecânicos para produzir uma variedade de tecidos prostéticos através de bioengenharia a serem mantidos em reserva até necessário por parte do doador. A utilização de próteses de tecido vivo em bioengenharia que melhor corresponde ao ambiente biológico *in vivo* e que providencia a carga fisiológica necessária para manter, por exemplo, o equilíbrio dinâmico de um ligamento normal totalmente funcional, deverá reduzir o tempo de reabilitação para um destinatário de umas próteses de meses para semanas, particularmente se o tecido é pré-

cultivado e armazenado. As vantagens incluem um regresso mais rápido às actividades funcionais, estadias mais curtas em hospitais e menos problemas com rejeições de tecido e falhas.

Os aspectos adicionais desta invenção são exemplificados nos seguintes exemplos. Será aparente para aqueles com experiência na técnica que muitas modificações, materiais e em termos de métodos, podem ser praticados sem sair do âmbito da invenção.

Num primeiro exemplo, as fibras do bicho-da-seda *Bombyx mori* puras, mostradas na Fig. 1A, foram extraídas para remover sericina, a proteína tipo cola que reveste a fibroína da seda (ver Figs. 1A-C). O número adequado de fibras por grupo foi disposto em paralelo e extraído numa solução aquosa de 0,02 M Na_2CO_3 e 0,3% (peso por volume) de solução de sabão IVORY durante 60 minutos a 90 °C, depois lavadas com água para extrair as proteínas sericina tipo cola.

A equação de Costello para uma geometria de corda helicoidal de três filamentos foi derivada para prever as propriedades mecânicas da construção baseada em fibra de seda. O modelo derivado é uma série de equações que, quando combinadas, têm em conta as propriedades do material de fibra extraído e a hierarquia desejada da construção de fibra para calcular a força geral e rigidez da construção de fibra como uma função do ângulo inclinado para um dado nível de hierarquia geométrica.

As propriedades do material de uma única fibra de seda incluem diâmetro da fibra, módulos de elasticidade, rácio de Poisson e a força de resistência à tracção (UTS). A hierarquia geométrica pode ser definida como o número de

níveis de torção num dado nível de construção de fibra.

Cada nível (por exemplo, grupo, conjunto, fio, corda, ligamento) é ainda definido pelo número de grupos de fibras torcidas umas nas outras e o número de fibras em cada grupo no primeiro nível torcido, onde o primeiro nível é definido como um grupo, o segundo nível como um conjunto, o terceiro como um fio e o quarto como uma corda, o quinto como o ligamento.

O modelo assume que cada grupo de múltiplas fibras age como uma única fibra, com um raio efectivo determinado pelo número de fibras individuais e o seu raio inerente, isto é, o modelo desconta a fricção entre as fibras individuais devido ao seu papel limitado num dado ângulo de inclinação relativamente alto.

As duas geometrias aplicáveis (Matriz 1 e Matriz 2) das muitas configurações geométricas da construção de fibra (ver Tabela 10, supra) calculadas para atingir propriedades mecânicas que imitam aquelas de um ACL nativo foram derivadas para análise mais pormenorizada. Foi seleccionada uma construção de seis cordas para usar como substituição do ACL. As configurações da matriz são as seguintes: Matriz 1: 1 prótese ACL = 6 cordas paralelas; 1 corda = 3 fios torcidos (3 torções/cm); 1 fio = 6 conjuntos torcidos (3 torções/cm); 1 conjunto = 30 fibras lavadas torcidas; e Matriz 2: 1 Matriz ACL = 6 cordas paralelas; 1 corda = 3 fios torcidos (2 torções/cm); 1 fio = 3 conjuntos torcidos (2,5 torções/cm); 1 conjunto = 3 grupos (3 torções/cm); 1 grupo = 15 fibras de fibroína de seda extraídas paralelas. O número de fibras e geometrias foi seleccionado de modo a que as próteses de seda sejam semelhantes às propriedades biomecânicas do ACL em UTS, rigidez linear, limite de

elasticidade e % de alongamento ao partir (ver Tabela 10, supra) servindo assim como ponto de início sólido para o desenvolvimento de um ACL com tecido criado através de engenharia.

As propriedades mecânicas da fibroína da seda foram caracterizadas usando um sistema de compressão/tensão servo-hidráulico Instron 8511 com software Fast-Track (Instron Corp., Canton, Massachusetts, USA) (ver Fig. 1D). Foram realizadas análises únicas de fadiga e puxar até falhar (pull-to-failure) em fibras de seda únicas, fibroína extraída e cordas organizadas. As fibras e fibroína foram organizadas em ambas as geometrias helicoidais paralelas da Matriz 1 (ver Fig. 2C) e da Matriz 2 (Ver Fig. 2D) para caracterização. O teste de puxar até falhar (pull-to-failure) foi realizado numa taxa de esforço de 100%/seg.; foram gerados histogramas de alongamento de força e a informação analisada usando software Instron Series IX. A Matriz 1 e Matriz 2 produziram propriedades mecânicas e de fadiga semelhantes ao ACL em UTS, rigidez linear, limite de elasticidade e alongamento de percentagem na falha (Ver Tabela 10 e Figs. 3A-D).

As análises de fadiga foram realizadas usando um sistema de tensão/compressão servo-hidráulico Instron 8511 com software Wavemaker, em cordas únicas da Matriz 1 e Matriz 2. A informação foi extrapolada para representar a prótese de 6 cordas do ACL, que foi mostrada nas Figs. 3B e 3D. O final das cordas foi embebido num molde de epóxi para gerar uma construção de 3 cm entre os apoios. Os ciclos de falha na UTS de 1,680 N e 1,200 N (n=5 para cada carga) para a Matriz 1 (ver Fig. 3B) e a UTS de cargas de 2280 N, 2100 N e 1800 N (n=3 para cada carga) para a Matriz 2 (ver Fig. 3D) foram determinados usando uma função sinusoidal H a 1 Hz gerado

pelo software Wavemaker 32 versão 6.6 (Instron Corp.). O teste de fadiga foi realizado numa solução neutra tampão de soro com fosfato (PBS) à temperatura ambiente.

A remoção completa de sericina foi observada após 60 min. a 90 °C como determinado pelo SEM (ver Figs. 1A-C). A remoção de sericina das fibras de seda alterou a ultraestrutura das fibras, resultando numa superfície da fibra mais suave, e a fibroína de seda foi revelada (mostrada nas Figs. 1A-C), com diâmetro médio que varia entre 20-40 µm. A fibroína exibiu uma diminuição significativa de 15,2% na força de resistência à tracção (1,033 +/- 0,042 N/fibra a 0,876 +/- 0,1 N/fibra) ($p < 0,05$, emparelhado com teste t de Student) (ver Fig. 1D). As propriedades mecânicas das matrizes de seda otimizadas (ver Figs. 2A-D e Figs. 3A-D) são resumidas na Tabela 11 e na Fig. 3A (para a Matriz 1) e na Fig. 3C (para a Matriz 2). É evidente a partir destes resultados que as matrizes de seda otimizadas exibiram valores comparáveis àqueles do ACL nativo, que foram reportados ter uma resistência à tracção média (UTS) de ~2100 N, rigidez de ~250 N/nm, limite de elasticidade e 33% de alongamento na falha (ver Woo, SL-Y, et al., The Tensile Properties of Human Anterior Cruciate Ligament (ACL) and ACL Graft Tissue in Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair, 279-289, Ed. D. Daniel et al., Raven Press 1990).

A análise de regressão da informação da fadiga da construção de fibra, mostrada na Fig. 3B para a Matriz 1 e na Fig. 3D para a Matriz 2, quando extrapolada para níveis de carga fisiológica (400 N) prevê o número de ciclos até à falha *in vivo*, indicou uma vida de construção de fibra de 3,3 milhões de ciclos para a Matriz 1 e uma vida superior a 10 milhões de ciclos para a Matriz 2. A concepção helicoidal da construção de fibra, utilizando fibras de seda lavada,

resultou numa construção de fibra com propriedades estruturais fisiologicamente equivalentes, confirmando a sua adequação como suporte para fabrico de tecido de ligamento.

Noutro exemplo que envolve o isolamento e cultura celular, as células estromais de medula óssea (BMSC), as células pluripotentes capazes de diferenciar linhagens osteogénicas, condrogénicas, tendonogénicas, adipogénicas e miogénicas, foram escolhidas uma vez que a formação das condições adequadas pode dirigir a sua diferenciação para uma linha celular de fibroblasto de ligamento desejado (Markolf et al., J. Bone Joint Surg. 71A: 887-893,1989; Caplan et al., Mesenchymal stem cells and tissue repair, The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts, Ed. D. W. Jackson et al., Raven Press, Ltd, New York, 1993; Young et al., J. Orthopaedic Res. 16:406-413,1998).

As BMSC humanas foram isoladas da medula óssea a partir da crista ilíaca de doadores que consentiram, com pelo menos 25 anos de idade, por um fornecedor comercial (Cambrex, Walkersville, MD). Vinte e dois milímetros de medula humana foi assepticamente aspirada para uma seringa de 25 ml contendo três mililitros de soro heparinizado (1000 unidades por mililitro). A solução de medula óssea heparinizada foi enviada em gelo para o laboratório, para isolamento e cultura de células estromais de medula óssea. Após chegar ao fornecedor, os vinte e cinco mililitros de aspirado foram ressuspensos em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina (P/S) e 1 ng/ml de factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Life Technologies, Rockville, MD) e dispostos em 8-10 microlitros de aspirado/cm² em frascos de cultura de tecido. O meio recente foi adicionado

ao aspirado de medula, duas vezes por semana, até 9 dias da cultura. Foram seleccionadas BMSC com base na sua capacidade de aderir ao plástico de cultura de tecido; células hematopoéticas não aderentes foram removidas durante o meio de substituição após 9-12 dias em cultura. O meio foi alterado duas vezes por semana após isso. Quando as BMSC primárias se tornaram quase confluentes (12-14 dias), foram removidas usando 0,25% de tripsina/1 nM EDTA e substituídas em 5×10^3 células/cm². As hBMSC de primeira passagem (P1) foram tripsinizadas e congeladas em 8% de DMSO/10% FBS/DMEM para uso futuro.

As hBMSC P1 foram descongeladas, dispostas novamente em 5×10^3 células/cm² (P2), tripsinizadas quando perto da confluência e usadas para inoculação da construção de fibra. As matrizes de seda esterilizadas (óxido de etileno) (especificamente, cordas únicas de Matrizes 1 e 2, conjuntos de 30 fibras paralelas de seda extraídas, e cordas helicoidais de fibras de colagem) foram inoculadas com células em câmaras de inoculação personalizadas (1 ml de volume total) maquinadas em blocos de Teflon para minimizar o volume do meio de célula e aumentar o contacto da construção de fibra - célula. As matrizes inoculadas, após 4 horas de período de incubação com a suspensão espessa da célula ($3,3 \times 10^6$ /BMSC/ml) foram transferidas para uma placa petri contendo uma quantidade adequada de meio de cultivo de célula para a duração das experiências.

Para determinar a taxa de degradação da fibroína da seda, a resistência à tracção (UTS) foi medida como uma função do período de cultivação em condições de crescimento fisiológico, isto é, no meio de cultura da célula. Grupos de 30 fibras de seda paralelas com 3 cm de comprimento foram extraídos, inoculados com hBMSC e cultivados na fibroína ao

longo de 21 dias a 37 °C e 5% de CO₂. Os grupos de controle não inoculados foram cultivados em paralelo. A UTS de fibroína da seda foi determinada como uma função da duração da cultura para grupos inoculados e não inoculados.

A resposta das células estromais da medula óssea à construção de fibra de seda foi também examinada.

As BMSC ligaram-se rapidamente e cresceram na seda e matrizes de colagénio após 1 dia em cultura (ver Figs. 7A-C e Fig. 16A), e formaram extensões celulares para ligar fibras próximas. Como mostrado na Fig. 7D e Fig. 16B, uma folha uniforme de células que cobrem a construção foi observada aos 14 e 21 dias de cultura, respectivamente. A análise MTT confirmou a total cobertura da construção de fibra por BMSC inoculadas após 14 dias em cultura (ver Figs. 8A-B). A quantificação de ADN total das células cultivadas na Matriz 1 (ver Fig. 9A) e Matriz 2 (ver Fig. 9B) confirmaram que as BMSC proliferaram e cresceram na construção de seda com a maior quantidade de ADN medida após 21 e 14 dias, respectivamente, em cultura.

Os grupos de fibroína de seda de 30 fibras de controle extraídos inoculados com BMSC e não inoculados, mantiveram a sua integridade mecânica como uma função do período de cultura após 21 dias (Ver Fig. 10).

A análise RT-PCR das BMSC inoculadas nas cordas da Matriz 2 indica que o colagénio I e II não foram regulados ao longo dos 14 dias em cultura (Fig. 14). O colagénio tipo 2 e sialoproteína óssea (como indicadores de cartilagem e diferenciação específica do osso, respectivamente) não foram detectáveis ou negligenciavelmente expressos ao longo do período de cultura. A RT-PCR quantitativa em tempo-real,

aos 14 dias, rendeu um rácio de transcrição de colagénio I para colagénio III, normalizado para GAPDH, de 8,9:1 (ver Fig. 17). O elevado rácio de colagénio I para colagénio III indica que a resposta não é a cicatrização de ferida ou formação de tecido de cicatrização (como é observado com altos níveis de colagénio tipo III), mas em vez disso, é específico do ligamento; o rácio relativo de colagénio I para colagénio III num ACL nativo é ~6,6:1 (Amiel et al., Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair, 1990).

Adicionalmente, são realizados estudos para providenciar informação na influência de estimulação mecânica multidimensional na formulação do ligamento a partir de células estromais de medula óssea no sistema reactor biológico. O reactor biológico é capaz de aplicar forças multidimensionais cíclicas concorrentes mas independentes (por exemplo, transladação, rotação) aos ligamentos em desenvolvimento. Após 7 a 14 dias de período de descanso estático (tempo após inoculação), as taxas de esforço de rotação e translação, e deformação linear e rotacional são mantidas constantes durante 1 a 4 semanas. O esforço translacional (3,3%-10%, 1-3 mm) e o esforço rotacional (25%, 90°) são concorrentemente aplicados a uma frequência de 0,0167 Hz (um ciclo completo de tensão e relaxamento por minuto) para as matrizes com base em seda inoculada com BMSC; um conjunto de outro modo idêntico de reactores biológicos com matrizes inoculadas sem carga mecânica serve como controlo. Os ligamentos são expostos a forças cíclicas constantes durante a duração dos dias da experiência.

Após o período de cultura, as amostras de ligamento, tanto as mecanicamente desafiante como as de controlo (estáticas) são caracterizadas por: (1) aparência histomorfológica geral

(por inspecção visual); (2) distribuição celular (processamento de imagem de secções marcadas com MTT e histológicas); (3) morfologia e orientação das células (análise histológica); e (4) a produção de marcadores específicos de tecido (RT-PCR, imunomarcação).

A estimulação mecânica afecta marcadamente a morfologia e organização das BMSC e a construção de fibra extracelular recém-desenvolvida, a distribuição de células ao longo da construção da fibra, e proliferação de uma cascata de diferenciação específica do ligamento; as BMSC alinham-se ao longo do eixo da fibra, têm uma morfologia esferóide similar aos fibroblastos do ligamento/tendão e proliferam os marcadores específicos do ligamento/tendão. Espera-se que a construção de fibra extracelular recém-formada (isto é, a composição de proteínas produzidas pelas células) alinhe ao longo das linhas de carga bem como ao longo do eixo da construção de fibra. Espera-se que o estímulo mecânico directo melhore o desenvolvimento do ligamento e formação *in vitro* num reactor biológico que resulta das BMSC inoculadas numa nova construção de fibra com base em seda. A orientação longitudinal das células e construção de fibra recém-formada é semelhante aos fibroblastos do ligamento encontrado num ACL *in vivo* (Woods et al., Amer. J. Sports Med. 19:48-55,1991). Além disso, a estimulação mecânica mantém o rácio de estimulação mecânica correcto entre os transcriptos de colagénio do tipo I e transcriptos de colagénio do tipo III (por exemplo, superior a 7:1) indicando a presença de tecidos de ligamentos recém-formados versus a formação de tecido de cicatrização. Os resultados acima irão indicar que o dispositivo mecânico e sistema reactor biológico providenciam um ambiente adequado (por exemplo, estirpes multidimensionais) para formação *in vitro* de ligamentos de tecido criados através de engenharia, com início em células

estromais de medula óssea e a construção inovadora de fibra de base em seda.

As condições de cultivo utilizadas nestas experiências preliminares podem ser ainda mais expandidas para melhor reflectir o ambiente fisiológico de um ligamento (por ex., aumentar os diferentes tipos de forças mecânicas) para a criação *in vitro* de equivalentes funcionais de ACL nativo para potencial uso clínico. Estes métodos não são limitados à criação de um ACL através de engenharia. Ao aplicar a magnitude apropriada e variedade de forças experienciadas *in vivo* qualquer tipo de ligamento no corpo, bem como outros tipos de tecido, podem ser produzidos *ex vivo* pelos métodos desta descrição.

Tabela 1: Resistência à tração e rigidez (N/mm numa amostra de 3 cm de comprimento) como uma função da extração de sericina de 10 fibras de fio de seda de bichos-da-seda com 0 torções por polegada (isto é, paralelas) e (i) temperatura e (ii) tempo. As amostras de repetição foram processadas dois anos após as amostras iniciais sem qualquer alteração significativa nas propriedades. N=5 para todas as amostras

Fio	Nº.de fibras	Temp.	Tempo	UTS (N)	d.p.	Rigidez (N/mm)	d.p.	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
10(0)	10	RT	60min	10,74	0,83	6,77	0,65	1,07	0,68
10(0)	10	RT	60min (repetir)	10,83	0,28	6,36	0,14	1,08	0,64
10(0)	10	33C	60min	10,44	0,17	6,68	0,55	1,04	0,67
10(0)	10	37C	60min	9,60	0,84	6,09	0,59	0,96	0,61
10(0)	10	37C	60min (repetir)	9,54	0,74	5,81	0,67	0,95	0,58
10(0)	10	90C	15 min.	9,22	0,55	4,87	0,62	0,92	0,49
10(0)	10	90C	30 min	8,29	0,19	4,91	0,33	0,83	0,49
10(0)	10	90C	60 min	8,60	0,61	4,04	0,87	0,86	0,40
10(0)	10	90C	60min (repetir)	8,65	0,67	4,55	0,69	0,87	0,46
10(0)	10	94C	60min	7,92	0,51	2,42	0,33	0,79	0,24
9(12s)x3(9z)	27	Não extraído		24,50	0,38	8,00	0,49	0,91	0,30
9(12s)x3(9z)	27	90C	60 min	21,88	0,18	7,38	0,34	0,81	0,27
9(6s)x3(3z)	27	Não extraído		24,94	0,57	9,51	0,57	0,92	0,35
9(6s)x3(3z)	27	90C	60 min	21,36	0,40	7,95	1,00	0,79	0,29
9(12s)x3(6z)	27	Não extraído		24,69	0,65	9,08	0,56	0,91	0,34
9(12s)x3(6z)	27	90C	60 min	21,80	0,47	7,48	0,97	0,81	0,28

Tabela 2. Perda de massa como função da extração de sericina. +/- 0,43% de desvio padrão de um N=5, reflecte a maior precisão que pode ser conseguida ao confirmar a remoção de sericina, isto é, 0,87 ou 1% de erro será sempre inerente aos métodos usados e uma perda de massa de cerca de 24% representa construções substancialmente livres de sericina.

Fio	Não extraída e seca (mg)	Extraída e seca (mg)	% perda de massa
9(12) x 3(6)	57,6	43,6	24,31
9(12) x 3(6)	58,3	43,9	24,70
9(12) x 3(6)	57,0	42,9	24,74
9(12) x 3(6)	57,2	42,7	25,35
média	57,53	43,28	24,77
Desvio padrão	0,57	0,57	0,43

Tabela 3. Ilustra a alteração na massa como uma função de uma segunda extracção de sericina. Correlacionada com as Figs. 1E – 1G, uma perda de massa inferior a 3% indica provavelmente uma perda de massa de fibroína devido aos danos mecânicos durante a 2ª extracção

fio	Massa após 1x extracção, seca (mg)	Massa após 2x extracção, seca (mg)	% perda de massa
9(12) x 3(6)	42,5	41,7	1,88
9(12) x 3(6)	43,1	42	2,55
9(12) x 3(6)	43,1	42,1	2,32
9(12) x 3(6)	42,5	41,7	1,88
9(12) x 3(6)	42,6	42,4	0,47
9(12) x 3(6)	43,7	42,4	2,97
9(12) x 3(6)	43,4	42,9	1,15
9(12) x 3(6)	43,7	43,1	1,37
9(12) x 3(6)	44	43,2	1,82
média	43,18	42,39	1,82
Desvio padrão	0,56	0,57	0,76

Tabela 4

Geometria	Método dobra	Condição	Nº. de níveis de dobra	Total de nº. Fibras	Média UTS (N)	desv. padrão UTS (N)	% Média de along.	% de desv. padrão do along.	Rigidez média (N/mm)	Rigidez Desv. Padrão (N/mm)	UTS por Fibra	Rigidez por fibra
1(0)x3(10)	Cabo	Extraído	2	3	1,98	0,05	10,42	1,63	2,17	0,51	0,66	0,72
1(0)x4(10)	Cabo	Extraído	2	4	2,86	0,14	11,98	1,54	2,08	0,31	0,72	0,52
3(0) x 3(3)	Cabo	Extraído	2	9	6,72	0,17	12,30	0,72	4,54	0,16	0,75	0,50
1(0) X 3(10)x3(9)	Cabo	Extraído	3	9	6,86	0,23	13,11	1,45	4,06	0,36	0,76	0,45
2(0)x 6(11)	Cabo		2	12	7,97	0,26	10,05	0,91			0,66	
4(6)x3(3)	Torção	Não extraído	2	12	10,17	0,18	19,86	1,16			0,85	
1(0) x 3(10)x4(9)	Cabo	Extraído	3	12	9,29	0,19	14,07	0,98	5,10	0,31	0,77	0,43
1(0) x 4(11)x3(11)	Torção	Extraído	3	12	9,70	0,14	12,56	1,03	7,60	0,33	0,81	0,63
1(0) x 4(10)x 3(9)	Cabo	Extraído	3	12	8,78	0,17	14,25	1,09	5,10	0,32	0,73	0,43
15 (texturizado)	Texturiz.	Não extraído, Seco	1	15	10,62	0,68	10,76	1,70	4,75	0,30	0,71	0,316
30(0)	Paralelo	Extraído, húmido	1	30	20,24	1,46	26,32	3,51	1,14	0,15	0,67	0,038
30(0)	Paralelo	Incubado, 21 dias, húmido	1	30	19,73	2,10	20,70	6,03			0,66	
30(0)	Paralelo	Inoculado com células, 21 dias, húmido	1	30	20,53	1,02	29,68	7,08			0,68	
2 fibras por portador num 8	Entrelaçado	Extraído, seco	2	16	10,93	0,13			6,96	1,14	0,68	0,435
4 fibras por portador num 8	Entrelaçado	Extraído, seco	2	32	24,60	0,22			12,39	0,53	0,77	0,387
4(6)x3(3) em 4 portadores	Entrelaçado	Extraído, seco	3	48	37,67	0,18	22,38	0,98			0,78	
15(0) x 3(12)	Cabo	Seco	2	45	27,39	0,62	31,68	1,35	4,63	0,49	0,61	0,102889
15(0)x3(12)x3(10)	Cabo	Não extraído, 1 dia após fabrico	3	135	73,61	6,00	33,72	5,67	12,33	1,53	0,55	0,091333
15(0) x 3(12) x 3(10)	Cabo	Não extraído, 2 dias após fabrico	3	135	72,30	5,68	31,18	4,35			0,54	
15(0) x 3(12)x3(10)	Cabo	Não extraído, 3 dias após fabrico	3	135	70,74	2,97	29,50	4,47			0,52	
15(0)x 3(12)x 3(10)	Cabo	Não extraído, 4 dias após fabrico	3	135	75,90	1,57	34,57	4,12			0,56	
15(0) x3(12) x3(10)	Cabo	Não extraído, 5 dias após fabrico	3	135	71,91	5,71	36,72	3,75			0,53	
15(0) x3(12) x3(10)	Cabo	Não extraído, 6 dias após fabrico	3	135	74,57	1,45	37,67	4,27			0,55	
13(0)x 3(11) x3(10) x3(0)	Cabo	Não extraído, seco	4	351	189,01	14,00	45,87	3,72			0,54	
13(0) x3(11) x3(10) X3(0)	Cabo	Não extraído, feito ciclo 30x para pré-tensão, seco	4	351	170,12	7,37	39,95	1,37			0,48	

Tabela 5: Comparação de UTS e rigidez entre condições de teste mecânicas húmidas (incubação de 2h em PBS a 37°C) e secas. N=5.

Os resultados mostram, aproximadamente, uma diminuição de 17% em UTS como função de teste húmido.

Fio	Nº de fibras	Condições de Teste do Fio	UTS (N)	UTS desv.padrão	Rigidez (N/mm)	Rigidez Desv.padrão	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
9(12s) x 3(9z)	27	extraído-seco	21,88	0,18	7,38	0,34	0,81	0,27
9(12s) x 3(9z)	27	extraído-húmido	18,52	0,25	2,56	0,31	0,69	0,09
9(6s) x 3(3z)	27	extraído-seco	21,36	0,40	7,95	1,00	0,79	0,29
9(6s) x 3(3z)	27	extraído-húmido	17,94	0,30	2,40	0,28	0,66	0,09
9(12s) x 3(6z)	27	extraído-seco	21,80	0,47	7,48	0,97	0,81	0,28
9(12s) x 3(6z)	27	extraído-húmido	18,74	0,22	2,57	0,11	0,69	0,10
12(0) x 3(10s)	36	extraído-seco	30,73	0,46	16,24	0,66	0,85	0,45
12(0) x 3(10s)	36	extraído-húmido	25,93	0,29	6,68	0,70	0,72	0,19
4(0) x 3(10s) x 3(9z)	36	extraído-seco	30,07	0,35	15,49	1,06	0,84	0,43
4(0) x 3(10s) x 3(9z)	36	extraído-húmido	22,55	0,66	7,63	1,00	0,63	0,21

Tabela 6. Efeito da TPI na UTS e Rigidez. N=5

Fio	TPI	UTS (N)	Desv. padrão	Rigidez (N/mm)	Desv. padrão	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
12(0) x 3(2)	2	23,27	0,28	6,86	0,60	0,65	0,19
12(0) x 3(4)	4	24,69	0,31	7,61	1,17	0,69	0,21
12(0) x 3(6)	6	25,44	0,42	6,51	1,35	0,71	0,18
12(0) x 3(8)	8	25,21	0,23	5,80	0,67	0,70	0,16
12(0) x 3(10)	10	25,94	0,24	6,45	0,77	0,72	0,18
12(0) x 3(12)	12	25,87	0,19	6,01	0,69	0,72	0,17
12(0) x 3(14)	14	22,21	0,58	5,63	0,71	0,62	0,16

Tabela 7. Informação TPI adicional para verificar que até 30 tpi pode ser usada sem causar danos no fio o que resultaria numa diminuição dramática em UTS e rigidez; nota, todas as matrizes (N = 5 por grupo) foram torcidas.

Fio	Nº de fibras	UTS (N)	Desv. Padrão (N)	Rigidez (N/mm)	Desv. Padrão (N/mm)	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)	Condições
1 (30) x 6(20) x 3(4,5)	18	10,92	0,44	1,21	0,02	0,61	0,07	Não extraído, húmido
1 (30) x 6(20) x 3(10)	18	11,48	0,37	1,25	0,06	0,64	0,07	Não extraído, húmido
1(30) x 6(6)	6	3,83	0,24	0,37	0,04	0,64	0,06	Não extraído, húmido
15(20)	15	13,19	0,27	6,03	0,67	0,88	0,40	Extraído, seco

Tabela 8. Efeito da hierarquia do fio nas propriedades mecânicas (isto é, o número de níveis e o número de fibras por nível podem influenciar significativamente os resultados do fio e tecido).

Geometria	Condição	Nº de níveis de dobra	Total do nº de fibras	UTS (N)	UTS desv. padrão (N)	% de média de along.	% de desv. padrão do along.	Rigidez média (N/mm)	Desv. padrão da rigidez (N/mm)	UTS por fibra	Rigidez por fibra
1(0)x3(10)	extraído	2	3	1,98	0,05	10,42	1,63	2,17	0,51	0,66	0,72
1(0) x 3(10) x 3(9)	extraído	3	9	6,86	0,23	13,11	1,45	4,06	0,36	0,76	0,45
1(0) x 3(10) x 4(9)	extraído	3	12	9,29	0,19	14,07	0,98	5,10	0,31	0,77	0,43
1(0) x 4(10)	extraído	2	4	2,66	0,14	11,98	1,54	2,08	0,31	0,72	0,52
1(0) x 4(10) x 3(9)	extraído	3	12	8,78	0,17	14,25	1,09	5,10	0,32	0,73	0,43
15(0)x3(12)	Não extraído seco	2	45	27,39	0,62	31,68	1,35	4,63	0,49	0,61	0,10
15(0) x 3(12) x 3(10)	Não extraído seco	3	135	73,61	6,00	33,72	5,67	12,33	1,53	0,55	0,09

Tabela 9. Efeitos da modificação de superfície (esterilização a gás de RGD e ETO) nas propriedades mecânicas da matriz de seda extraída; foi usado PBS como um controle negativo durante os tratamentos de modificação

Fio	Nº de fibras	Modificação/esterilização da superfície	UTS (N)	Desv. padrão	Rigidez (N/mm)	Desv. padrão	UTS/fibra (N)	Rigidez/fibra (N/mm)
12(0)x3(10s)	36	Não tratado	25,94	0,24	6,45	0,77	0,72	0,18
12(0) x 3(10s)	36	RGD	23,82	2,10	3,79	2,06	0,66	0,11
12(0) x 3(10s) x 3(9z)	108	Não tratado	48,89	4,84	9,22	0,84	0,45	0,09
12(0) x 3(10s) x 3(9z)	108	RGD	55,28	3,28	8,17	0,81	0,51	0,08
4(11s) x 3(11z) x 3(10s)	36	ETO	18,72	0,45	5,52	0,42	0,52	0,15
4(11s) x 3(11z) x 3(10s)	36	RGD + ETO	19,30	0,62	4,67	0,3	0,54	0,13

Tabela 10

	UTS (N)	Rigidez (N/mm)	Limite de elasticidade (N)	Alongamento (%)
Matriz 1 Seda	2337+/-72	354+/-26	1262+/-36	38,6+/-2,4
Matriz 2 Seda	3407+/-63	580+/-40	1647+/-214	29+/-4
ACL Humano	2160+/-157	242+/-28	~1200	~26-32%

Propriedades mecânicas para duas cordas diferentes com base no comprimento de corda de 3 cm, em comparação com propriedades de ACL humano

Tabela 11 :

Nível de Torção (n° de torções/cm)							
	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	Matriz 7
n° fibras por grupo	30 (0)	15 (0)	1300 (0)	180 (0)	20 (0)	10 (0)	15 (0)
n° grupos por conjunto	6 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3,5)	6 (3)	6 (3)	3 (3)
n° conjuntos por filamento	3 (3)	6 (2,5)	1 (0)	3 (2)	3 (2)	3 (2,5)	3 (2,5)
n° filamentos por corda	6 (0)	3 (2,0)	-	2 (0)	3 (1)	3 (2)	3 (2)
n° cordas por ACL	-	6 (0)	-	-	3 (0)	6 (0)	12 (0)
UTS (N)	2337	3407	2780	2300	2500	2300	3400
Rigidez (N/mm)	354	580	300	350	550	500	550

Exemplos de várias hierarquias geométricas que poderiam resultar em propriedades mecânicas adequadas para a substituição do ACL. Nota: A Matriz 1 e 2 foram desenvolvidas como mostrado nos exemplos; a Matriz 3 produziria uma única prótese de conjunto, a Matriz 4 produziria uma prótese de dois filamentos, a Matriz 5 produziria uma prótese de 3 cordas, a Matriz 6 é outra variação de uma prótese de 6 cordas e a Matriz 7 produziria uma prótese de 12 cordas.

Também descrito neste documento encontra-se um tecido que compreende: um fio, o dito fio compreendendo uma ou mais fibras de fibroína sem sericina, as ditas fibras sendo biocompatíveis e não aleatoriamente organizadas, em que o dito fio promove o crescimento de células em redor das ditas fibras de fibroína e é biodegradável.

As fibras de fibroína sem sericina podem compreender fibras de fibroína obtidas do bicho-da-seda *Bombyx mori*.

As fibras de fibroína sem sericina podem reter a sua estrutura de proteína nativa e podem não ter sido dissolvidas e reconstituídas.

O tecido pode ser não-imunogénico.

As fibras de fibroína podem incluir menos de 20% de sericina por peso, por exemplo menos de 10% de sericina por peso, ou menos de 1% de sericina por peso.

O fio pode ter uma resistência à tracção de, pelo menos, 0,52N por fibra, e opcionalmente uma rigidez entre cerca de 0,27 e cerca de 0,5 N/mm por fibra, e retém ainda opcionalmente 80% da sua UTS, quando testada húmida, ou tem um alongamento na falha entre cerca de 10% e cerca de 50%.

Quando o tecido tiver uma rigidez entre cerca de 0,27 e cerca de 0,5 N/mm por fibra e tiver um alongamento na falha entre cerca de 10% e cerca de 50%, o fio pode ter uma vida de fadiga de, pelo menos, 1 milhão de ciclos a uma carga de cerca de 20% da resistência à tracção do fio.

O fio pode compreender fibras de fibroína sem sericina, paralelas ou entrelaçadas, compreendendo opcionalmente três fibras de fibroína sem sericina alinhadas, as quais podem ser opcionalmente entrelaçadas e podem formar, por exemplo, um entrançado, fio texturado, fio torcido, fio cablado e combinações dos mesmos. Onde as fibras de fibroína sem sericina alinhadas sejam enroladas ou cabladas, têm 0 a 11,8 torções/cm.

O tecido pode ainda compreender um fio tendo uma organização hierárquica de nível único, a dita organização hierárquica de nível único compreendendo um grupo de fios paralelos ou entrançados.

O tecido pode ainda compreender um fio tendo uma organização hierárquica de dois níveis, a dita organização

hierárquica de dois níveis compreendendo um conjunto de grupos entrelaçados.

O tecido pode ainda compreender um fio tendo uma organização hierárquica de três níveis, a dita organização hierárquica de três níveis compreendendo um filamento de conjuntos entrelaçados.

O tecido pode ainda compreender um fio com uma organização hierárquica de quatro níveis, a dita organização hierárquica de quatro níveis compreendendo uma corda de filamentos entrelaçados.

O tecido pode ainda compreender um fio torcido em ou abaixo das 30 torções por polegada.

O tecido pode ter uma pluralidade de fios entrelaçados para formar um tecido.

O tecido pode compreender um composto de fibras de fibroína sem sericina e um ou mais polímeros degradáveis seleccionados do grupo que consiste de colagénios, ácido poliláctico ou seus copolímeros, ácido poliglicólico ou seus copolímeros, polianidridos, elastina, glicosaminoglicanos e polissacarídeos, e opcionalmente, em tal tecido, uma pluralidade de fios são organizados não aleatoriamente num tecido seleccionado do grupo que consiste de tecidos tecidos, tecidos tricotados, tecidos de malha-urdidura, tecidos unidos, tecidos revestidos, tecidos contracolados, tecidos laminados, malhas e combinações dos mesmos, ou uma pluralidade de fios são aleatoriamente organizados num tecido não-tecido.

Um tecido pode ainda compreender um fármaco associado com o tecido.

O tecido pode ainda compreender um factor de fixação de células associado ao tecido, por exemplo RGD.

O tecido pode ser tratado com plasma de gás.

O tecido pode ainda compreender células biológicas inoculadas no tecido.

É também descrito um método para formar um tecido que compreende:

- a) Alinhar as fibras de fibroína de seda em paralelo ou entrelaçadas com outras fibras de fibroína de seda para formar um fio,
- b) Remover sericina de forma substancial das fibras de fibroína de seda sem alterar, substancialmente, a estrutura nativa da fibroína nas fibras, e
- c) Organizar vários fios para formar um tecido.

O método pode ainda compreender entrelaçar as fibras de seda paralelas antes de a sericina ser extraída.

O método pode ainda compreender alinhar múltiplas fibras de fibroína em fios, em que cada fio compreende pelo menos três fibras paralelas ou entrelaçadas, opcionalmente onde as fibras de fibroína de cada fio são torcidas com 0 a 11,8 torções/cm.

O método pode compreender ainda vários fios torcidos com 0 a 11,8 torções/cm.

Opcionalmente, no método acima, a sericina é extraída de não mais do que cerca de 50 fibras de fibroína paralelas ou entrançadas.

O método pode ainda compreender fios torcidos em ou abaixo das 30 torções por polegada.

O método pode ainda compreender formar um tecido tecido ou malha a partir de uma pluralidade de fios organizados de forma não aleatória ou formar um tecido não-tecido a partir de uma pluralidade de fios aleatoriamente organizados. Em qualquer opção, o tecido pode ser formado após a sericina ser extraída das fibras nos fios ou o tecido pode ser formado antes de a sericina ser extraída das fibras dos fios, ou opcionalmente o fio pode ser exposto a uma força não superior ao seu limite de elasticidade.

O método pode ainda compreender associar um fármaco ao tecido.

O método pode ainda compreender associar um factor de fixação de células ao tecido, por exemplo, associar RGD ao tecido.

O método pode ainda compreender tratar o tecido com plasma de gás.

O método pode ainda compreender:

esterilizar o tecido.

Lisboa, 19 de Agosto de 2013

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

WO 9708315 A
US 5252285 A
US 5245012 A
US SN09950561 A

Literatura que não é patente citada na descrição

PEREZ-RIGUEIRO. J. Appl Polymer Science, 1998, vol. 70, 2439-2447

SOFIA ET AL. J. Biomed. Mater. Res., 2001, vol. 54, 139-148

Experimental Methods Used to Evaluate Knee Ligament Function. BIDEN ET AL. Knee Ligaments: Structure, Function Injury and Repair. Raven Press, 1990, 135-151

The Limits of Knee Motion. SHOEMAKER ET AL. Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair. Raven Press, 1990, 1534-161

CHEN ET AL. J. Biomed. Mat. Res., 1980, col. 14, 567-586

The tensile properties of human anterior cruciate ligament (ACL) and ACL graft tissues. WOO ET AL. Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair. Raven Press, 1990,

279-289

GRAY, H. Anatomy, Descriptive and Surgical. Bounty Books, 1977

The tensile Properties of Human Anterior Cruciate Ligament (ACL) and ACL Graft Tissue. WOO, SL-Y ET AL. Knee Ligaments: Structure, Function, Injury and Repair. Raven Press. 1990, 279-289

MARKOLF ET AL. J. Bone Joint Surg., 1989, vol. 71A, 887-893

Mesenchymal stem cells and tissue repair. CAPLAN ET AL. The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts. Raven Press, Ltd, 1993

YOUNG ET AL. J. Orthopaedic Res., 1998, vol. 16, 406-413

AMIEL ET AL. Knee Ligaments; Structure, Function, Injury and Repair, 1990

WOODS ET AL. Amer. J. Sports Med., 1991, vol. 19, 48-55

REIVINDICAÇÕES

1. Uma construção de fibra biodegradável de biomaterial para utilização num dispositivo medido compreendendo:

Um fio, o dito fio compreendendo uma ou mais fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina, alinhadas de forma não aleatória, em que as fibras de fibroína de seda sem sericina são substancialmente livres de sericina, que retêm, substancialmente, a sua estrutura de proteína nativa e não foram dissolvidas e reconstituídas, as ditas fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina sendo biocompatíveis, em que o dito fio promove o crescimento das células em redor das ditas fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina.

2. A construção de fibra como recitado na reivindicação 1, em que as fibras de fibroína de seda, de onde foi extraída a sericina, compreendem fibras de fibroína obtidas a partir do bicho-da-seda *Bombyx mori*.

3. A construção de fibra da reivindicação 1, em que a construção é substancialmente não-imunogénica.

4. A construção de fibra da reivindicação 1, em que as fibras de fibroína de seda de onde foi extraída a sericina incluem menos de 20% de sericina por peso.

5. A construção de fibra da reivindicação 1, em que o fio tem uma resistência à tracção de, pelo menos, 0,52 N por fibra.

6. A construção de fibra da reivindicação 5, em que o fio tem uma rigidez entre cerca de 0,27 e cerca de 0,5 N/mm por fibra.

7. A construção de fibra da reivindicação 6, em que o fio retém 80% da sua UTS quando testado húmido.

8. A construção de fibra da reivindicação 7, em que o fio tem um alongamento na falha entre cerca de 10% e cerca de 50%.

9. A construção de fibra da reivindicação 1, em que o fio compreende fibras de fibroína, de onde foi extraída a sericina, paralelas ou entrelaçadas.

10. A construção de fibra da reivindicação 1, compreende ainda um fio com uma organização hierárquica de nível único, a dita organização hierárquica de nível único compreendendo um grupo de fios paralelos ou entrelaçados.

11. A construção de fibra da reivindicação 1 compreende ainda um fio com uma organização hierárquica de dois níveis, a dita organização hierárquica de dois níveis compreendendo um conjunto de grupos entrelaçados.

12. A construção de fibra da reivindicação 1 compreende ainda um fio com uma organização hierárquica de três níveis, a dita organização hierárquica de três níveis compreendendo um fio de conjuntos entrelaçados.

13. A construção de fibra da reivindicação 1 compreende ainda um fio com uma organização hierárquica de quatro níveis, a dita organização hierárquica de quatro níveis compreendendo uma corda de fios entrelaçados.

14. A construção de fibra de acordo com a reivindicação 1, compreendendo um composto de: (i) fibras de seda e colagénio; (ii) espumas de seda e colagénio, malhas, ou esponjas; (iii) fibras de fibroína de seda e espumas de seda, malhas, ou esponjas; (iv) polímeros de seda e biodegradáveis; ou (v) polímeros de seda e não biodegradáveis.

15. Um dispositivo médico de suporte de tecido compreendendo uma construção de fibra de qualquer uma das reivindicações 1 a 14 para utilização de, pelo menos, em parte, suportar uma cavidade interna em tecidos moles após cirurgia, evitar aderências de tecidos e promover a fixação e crescimento de células.

Lisboa, 19 de Agosto de 2013



FIG. 1A

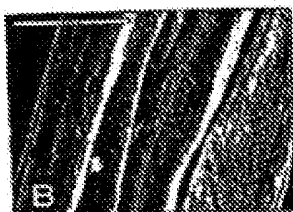


FIG. 1B

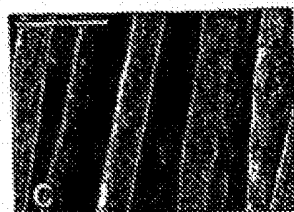


FIG. 1C

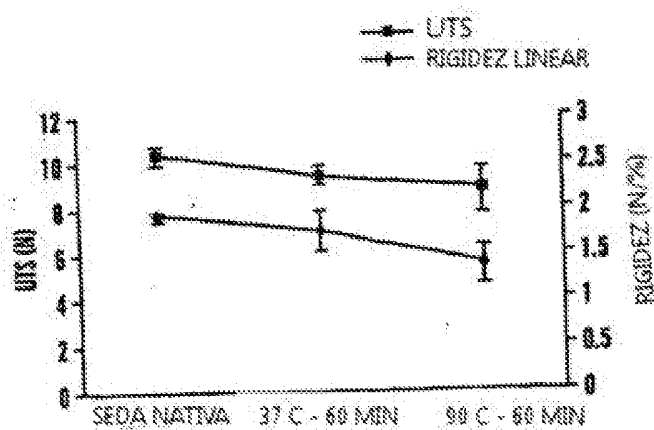
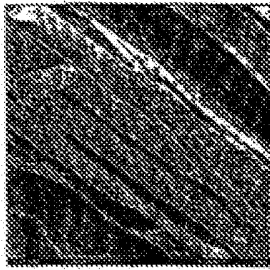
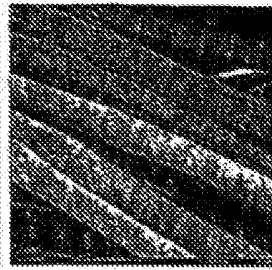


FIG. 1D



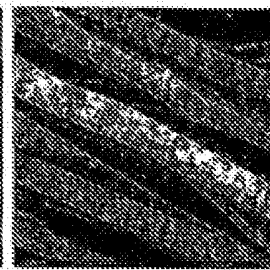
SEDA CRUA

FIG. 1E



1x SEDA LAVADA

FIG. 1F



2x SEDA LAVADA

FIG. 1G

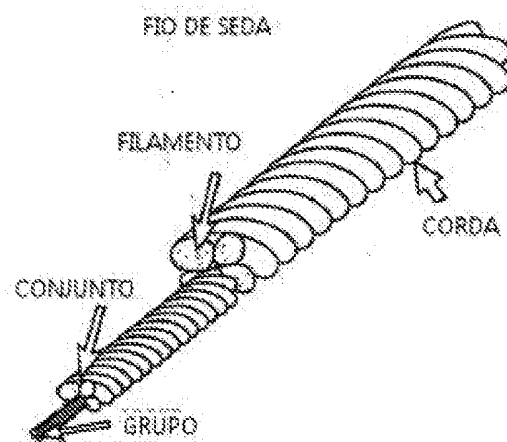


FIG. 2A

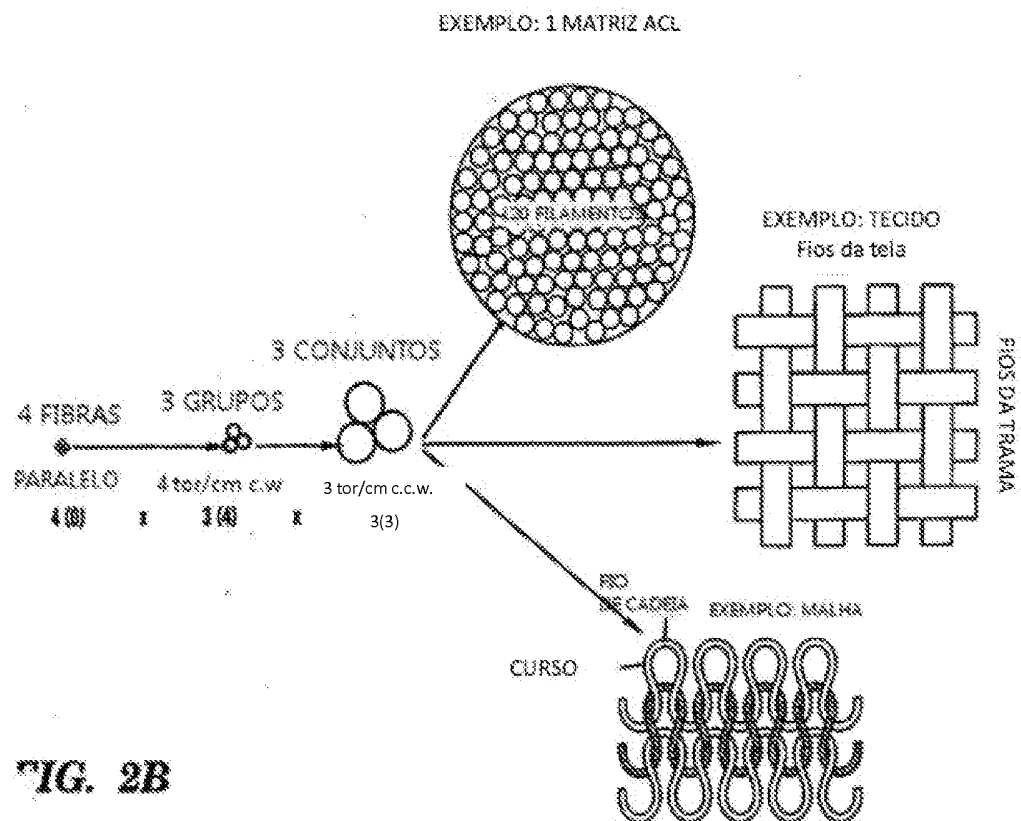


FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 2D

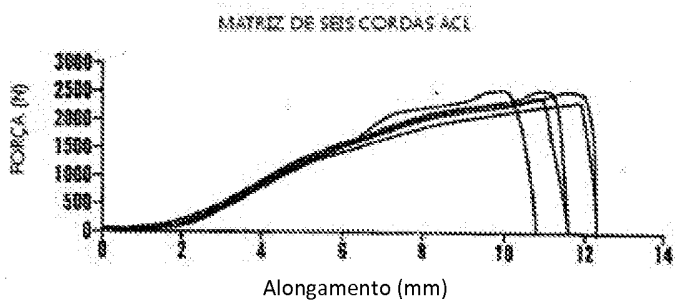


FIG. 3A

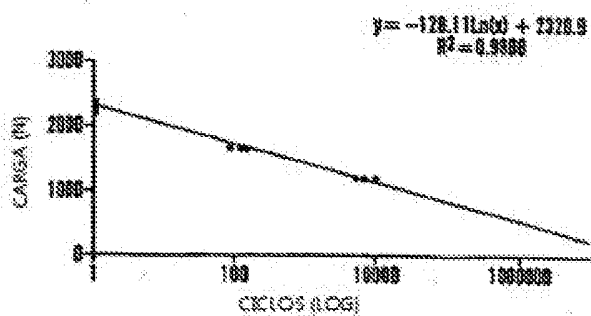


FIG. 3B

09/12/20

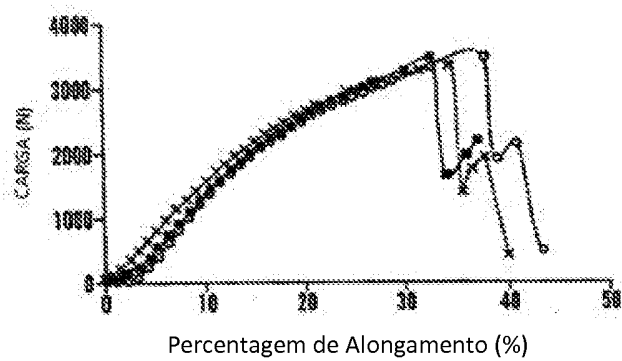


FIG. 3C

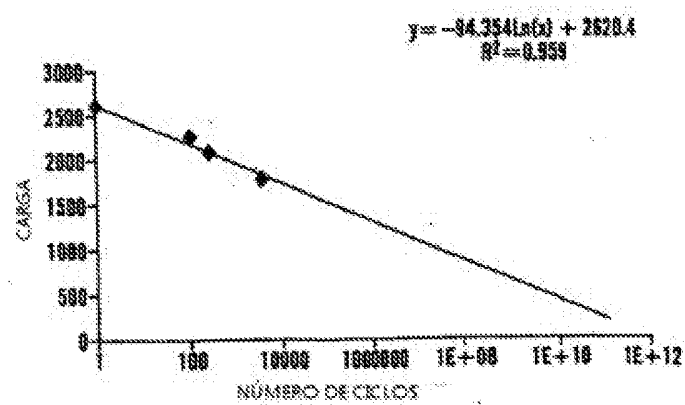


FIG. 3D

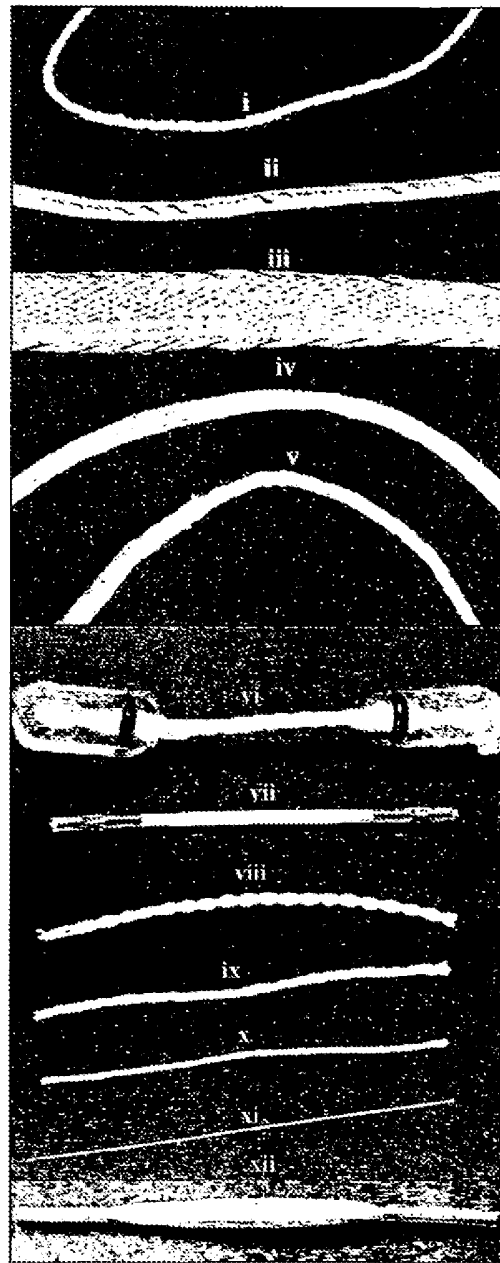


FIG. 4A

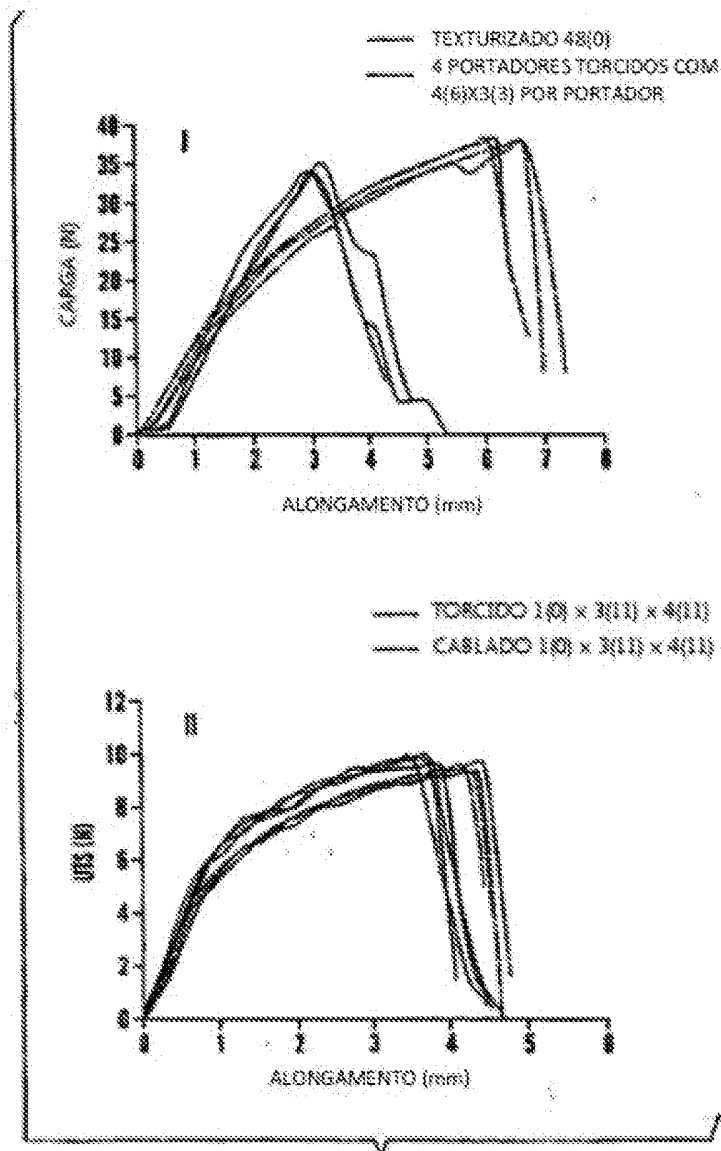


FIG. 4B

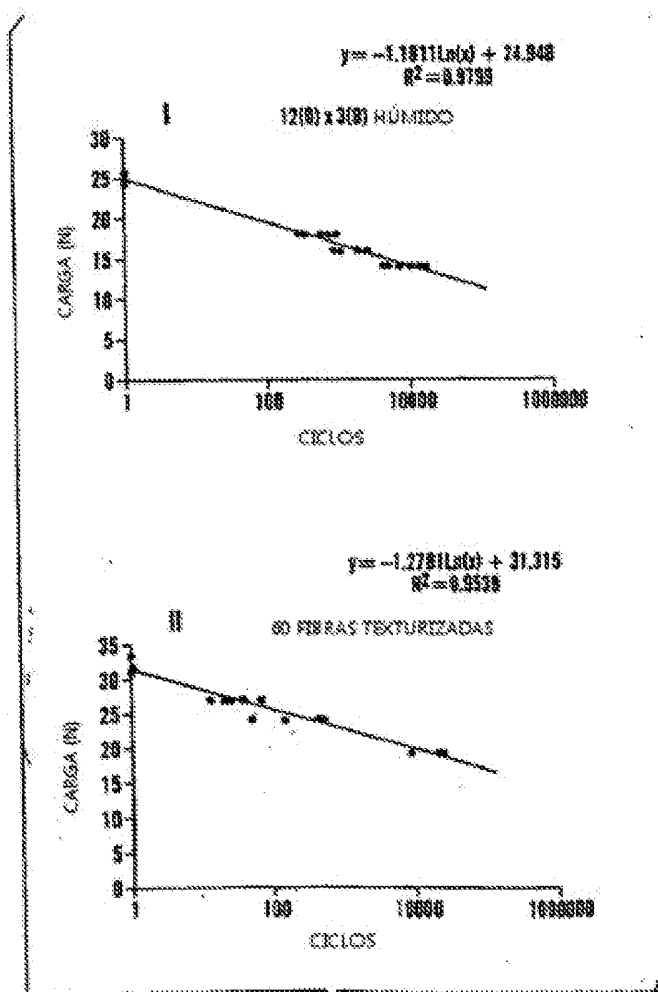


FIG. 4C

(TODAS EFECTUADAS EM 12(8) X 3(8), EXTRAÍDO E HÚMIDO)

TAXA ESPORÇO (mm/min)	UTS (N)	el. pacção (N)	RIGIDEZ (N/mm)	el. pacção (N/mm)
2050	24.8	8.68	3.76	1.94
2700	25.8	8.88	3.47	0.48
3000	24.3	8.53	3.82	0.12
36	22.5	8.78	2.74	0.08

FIG. 5A

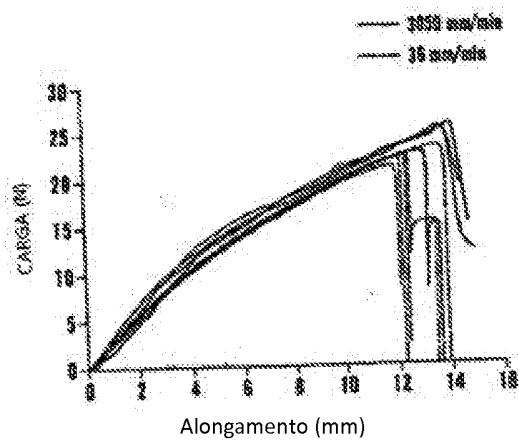


FIG. 5B

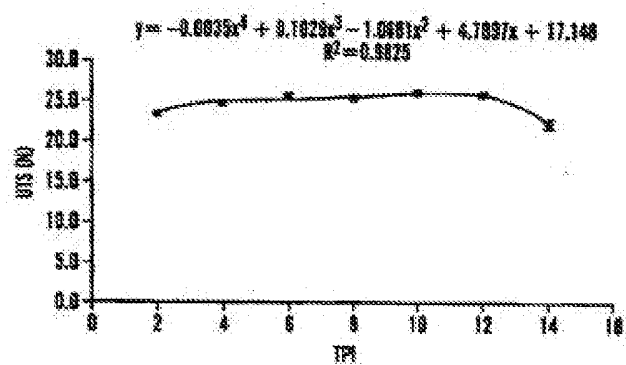


FIG. 6A

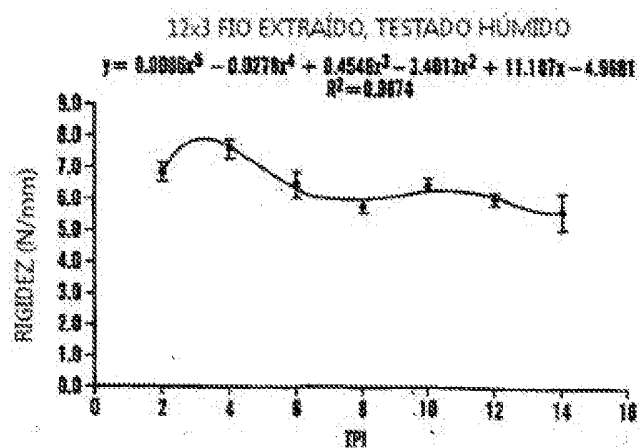


FIG. 6B



FIG. 7A

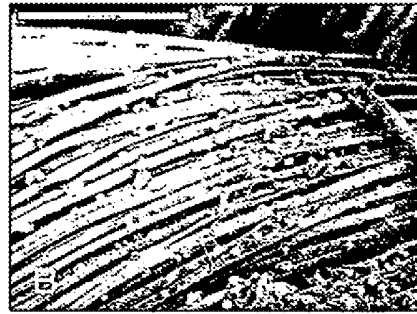


FIG. 7B



FIG. 7C



FIG. 7D

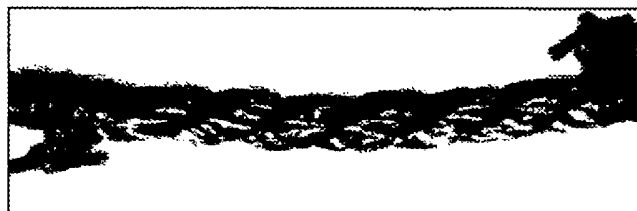


FIG. 8A

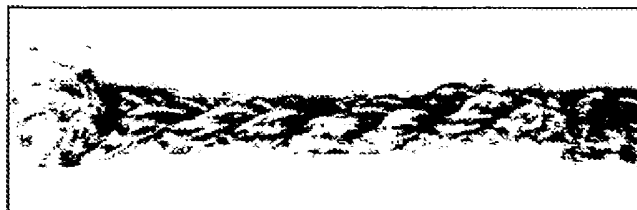


FIG. 8B

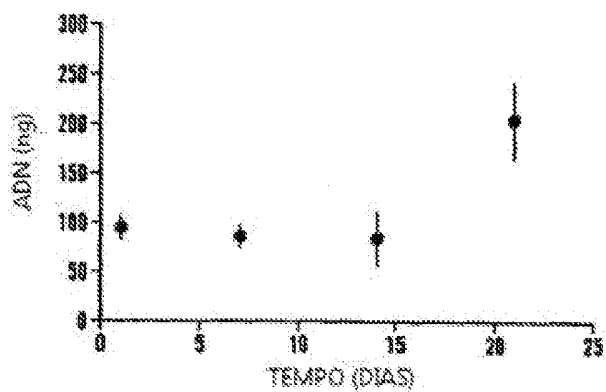


FIG. 9A

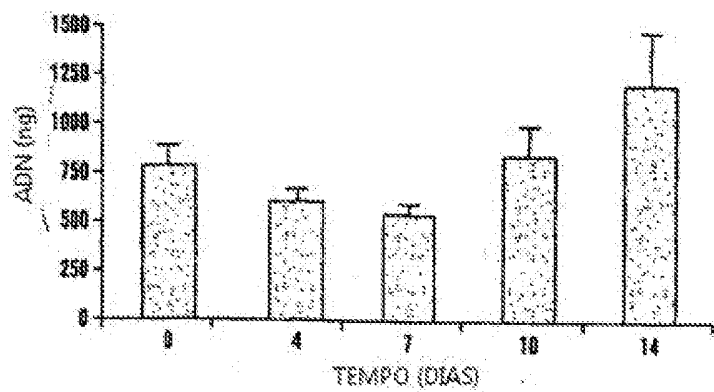


FIG. 9B

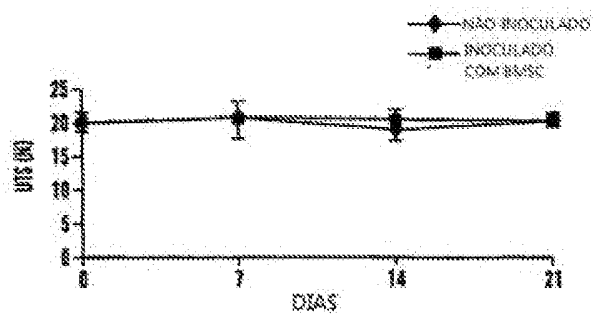
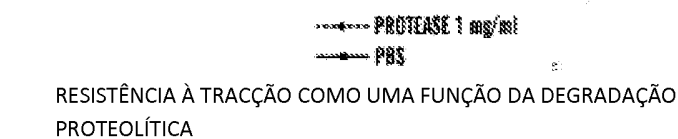


FIG. 10



$$y = 0.0292x^2 - 2.0834x + 55.871$$

$$R^2 = 0.9918$$

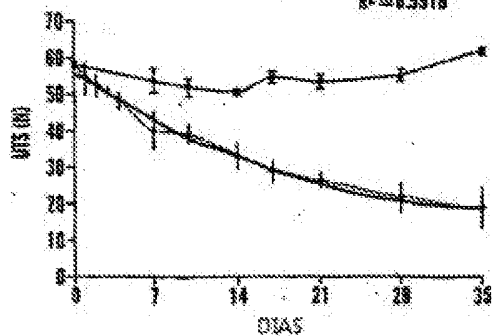


FIG. 11A

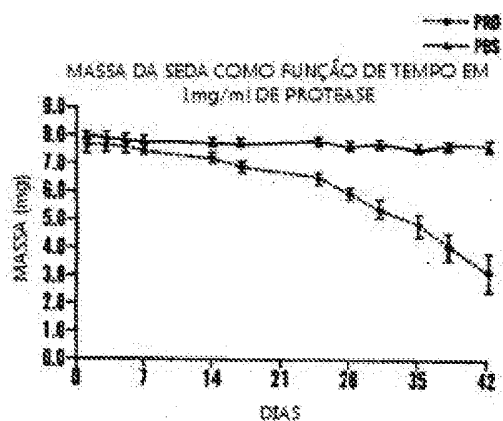


FIG. 11B

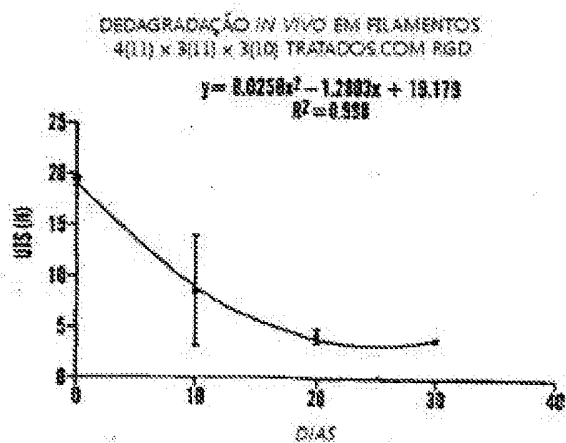


FIG. 12

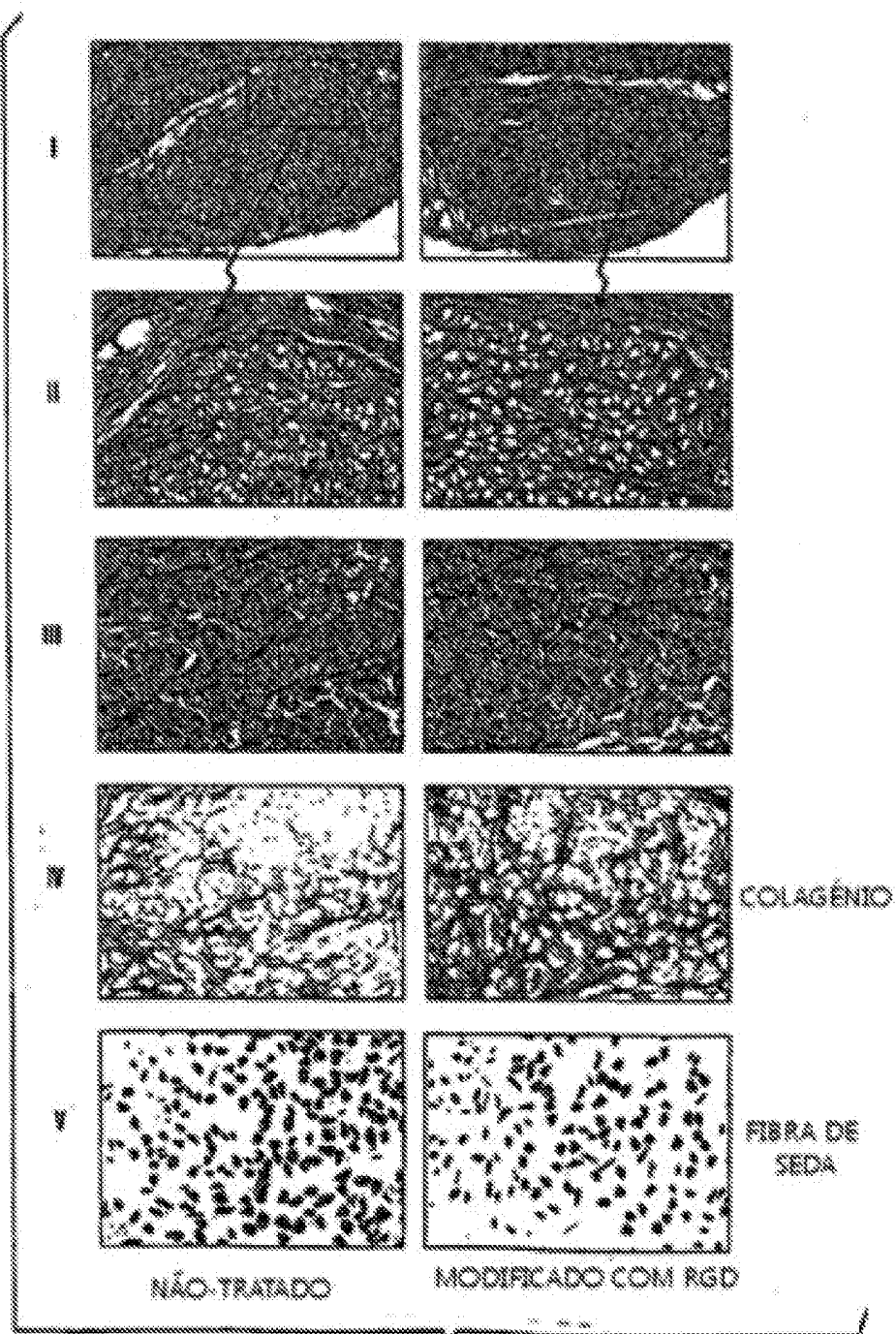


FIG 13 A

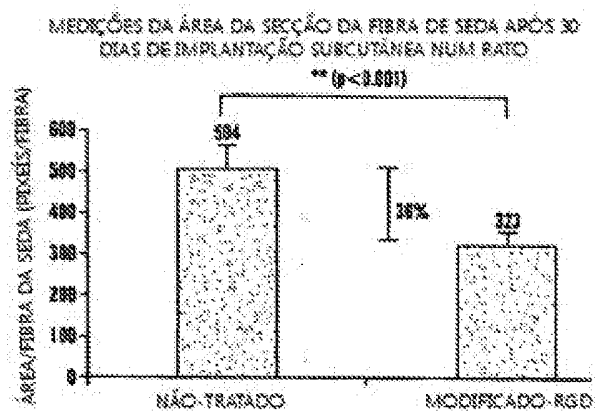


FIG. 13B

DEPOSIÇÃO DE COLAGÉNIO DENTRO DO FILAMENTO DE 36 FIBRAS APÓS 30 DIAS *IN VIVO*

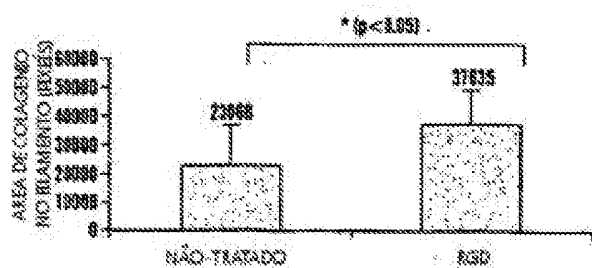


FIG. 13C

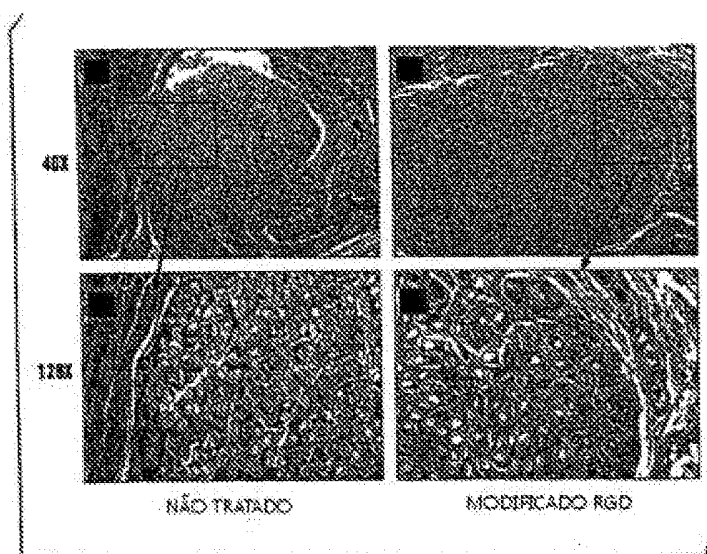


FIG. 13D

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	ÁREA DA SECÇÃO DA SEDA (mm ²)		ALTERAÇÃO DO DIA 10 ATÉ AO DIA 90 (%)
	10 DIAS	90 DIAS	
NÃO-TRATADO	0.000110	0.000115	2.5
PLASMA N ₂	0.000129	0.000990	28.8
PCB	0.000128	0.000982	38.4

FIG. 13E

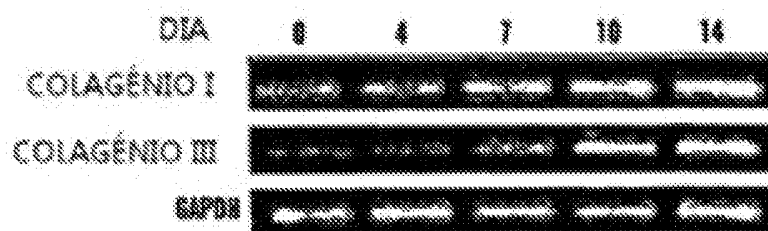
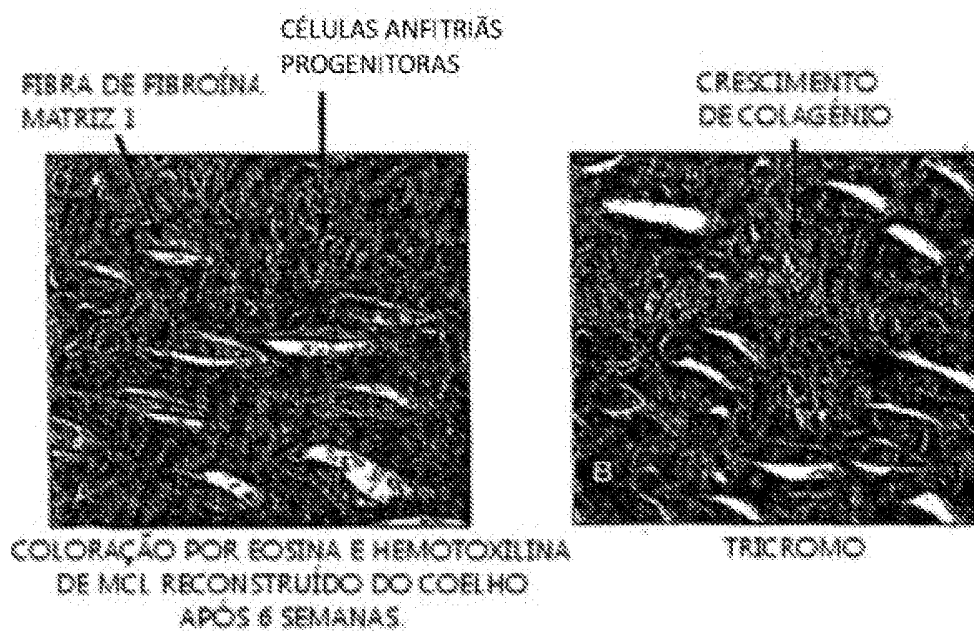


FIG. 14



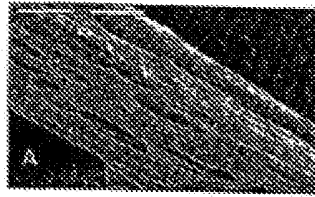


FIG. 16A



FIG. 16B

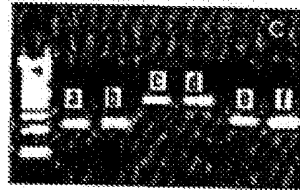


FIG. 16C

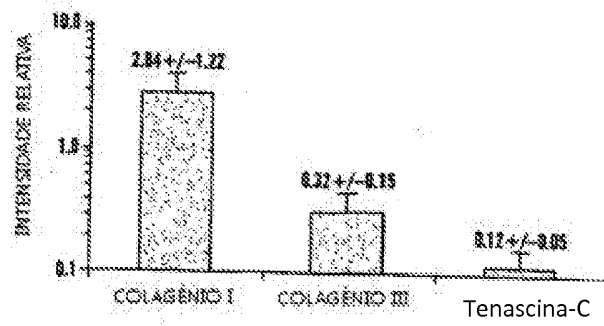
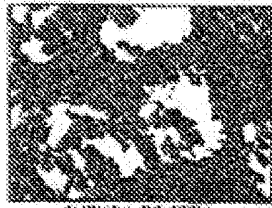
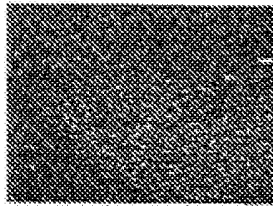


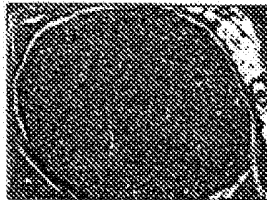
FIG. 17



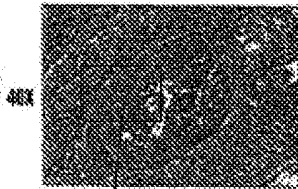
SUTURA DE SEDA
FIG. 18A



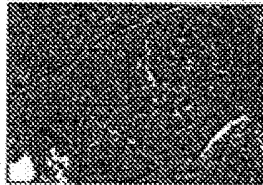
SEDA COM SUPERFÍCIE MODIFICADA COM RGD
FIG. 18B



SEDA COM CÉLULAS
FIG. 18C



40X
19C- **FIG. 19A**



19D- **FIG. 19B**



128X

43x3
FIG. 19C



128

FIG. 19D 09/14

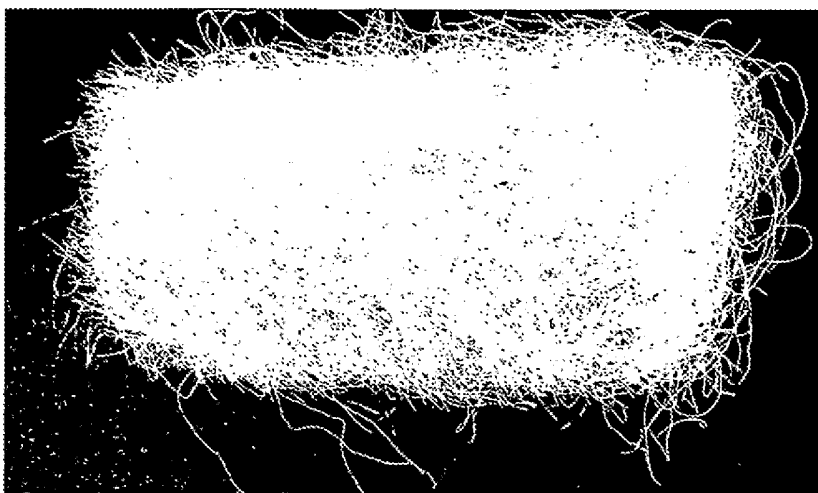


FIG. 20A

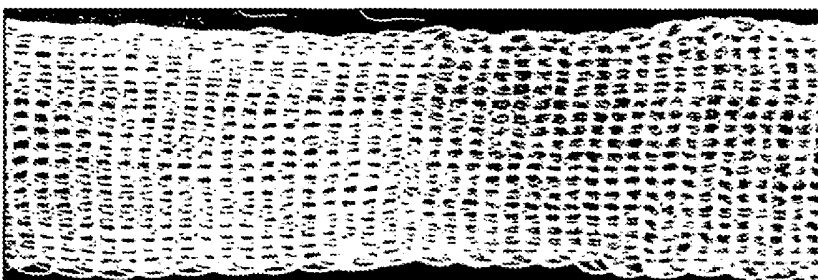


FIG. 20B

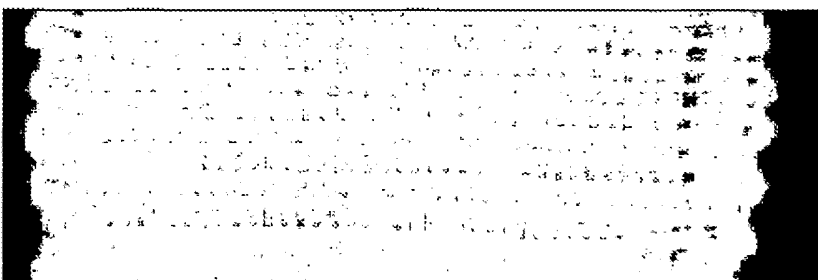


FIG. 20C

NOTAS: 1. PODER SER ACRICIONADO REINTEGRADO.
ADICIONAR EM QUALQUER PUNTO PARA CRIAR UM COMPOSTO.
1. ESTE PLANOGRAMA NÃO REPRESENTA TODOS OS CAMINHOS
POSSÍVEIS. 1 EM QUALQUER SÍTIO ONDE "TRICHO" É ESCRITO,
SIGNIFICANDO TRICHO, TRICHO OU MÚLTIPLO 4 EM QUALQUER
SÍTIO ONDE ESTEJA ESCRITO "HO TORCENDO", É ASSUMIDO SER
PARALELO, TORCIDO, CABLADO, TEXTURIZADO OU ENTRELAÇADO

FIG. 21

