

Joana Cristina Mendes Cruz de Sousa

“Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

Joana Cristina Mendes Cruz de Sousa

“Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

Joana Cristina Mendes Cruz de Sousa

“Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual”

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

(Joana Cristina Mendes Cruz de Sousa)

Porto, 2011

Resumo

Desde há várias décadas, a engenharia de tecidos tem sido uma área de intensa investigação, pela perspectiva de desenvolvimento de potenciais opções terapêuticas para quadros clínicos com prognóstico limitado.

O objectivo primordial da engenharia de tecidos é substituir ou regenerar estrutural e funcionalmente tecidos lesados. A metodologia envolve o cultivo de células sobre estruturas de suporte, os *scaffolds* sendo incorporadas moléculas bioactivas, que propiciam o crescimento celular.

As características arquitectónicas, biológicas e mecânicas dos *scaffolds* devem ser optimizadas de forma a favorecerem o crescimento celular e a minimizarem o risco de resposta imunitária.

Os progressos alcançados na regeneração do tecido cutâneo, nervoso, cardíaco e cartilagem são exemplos decisivos da aplicabilidade clínica da engenharia de tecidos. Porém, o número de aplicações clínicas bem sucedidas está limitado a algumas áreas, pelo que um dos desafios é o aumento do número de opções terapêuticas válidas.

Abstract

Since several decades ago, tissue engineering has been a topic of intense research carried out by the prospect of developing new therapeutic options with potential clinical applications in conditions with limited prognosis.

The primary aim of tissue engineering is to replace or regenerate damaged tissues, structurally and functionally. The methodology requires growing cells on supporting structures, the so-called scaffolds, and incorporating bioactive molecules, that favour cell growth.

The architectural features, biological and mechanical properties of scaffolds must be optimized in favouring of cell growth and minimizing the risk of immune response.

The progress made in regenerating skin, nerve and heart tissues and cartilage are decisive examples of clinical application of tissue engineering. However, the number of successful clinical applications is limited to certain areas, therefore the challenge is to increase the number of valid therapeutic options.

Agradecimentos

Um agradecimento especial à Doutora Eliana B. Souto pela disponibilidade, apoio e orientação ao longo da concretização deste projecto.

À minha família, em especial aos meus pais e irmão pelo incentivo e compreensão.

Aos meus amigos pelo ânimo e paciência ao longo destes longos meses de trabalho.

Índice

I. Introdução.....	11
II. <i>Scaffolds</i>	14
2.1 Arqitectura	14
2.2 Biocompatibilidade	16
2.3 Bioactividade	16
2.4 Propriedades físicas, químicas e mecânicas.....	16
2.5 Biomateriais	17
III. Pele	24
3.1 Substitutos da epiderme.....	27
3.2 Substitutos dérmicos.....	30
3.3 Substitutos dermo-epidérmicos	33
IV. Sistema cardiovascular	36
4.1 Válvulas cardíacas	36
4.2 Vasos sanguíneos.....	41
4.3 Miocárdio	45
V. Sistema Nervoso.....	49
5.1 Nervo periférico.....	49
5.2 Medula espinhal.....	52
5.3 Cérebro	56
VI. Cartilagem	58
VII. Conclusão	68
VIII. Bibliografia.....	70

Índice de figuras

Figura 1 Uma das principais metodologias com biomateriais em engenharia de tecidos	14
Figura 2 Abordagens actuais da engenharia de tecidos para regeneração da pele	26
Figura 3 Integra [®]	32
Figura 4 Dermagraft [®]	33
Figura 5 Úlcera do pé diabético tratada com Apligraf [®]	35
Figura 6 Válvulas cardíacas desenvolvidas pela engenharia de tecidos	37
Figura 7 Desenvolvimento de válvulas cardíacas através da engenharia de tecidos	38
Figura 8 Utilização de <i>scaffolds</i> para regeneração dos vasos sanguíneos	43
Figura 9 Lifeline TM	45
Figura 10 Implantação de <i>scaffolds</i> de colagénio	47
Figura 11 NeuraGen TM	51
Figura 12 Principais estratégias para a regeneração da medula espinhal	53
Figura 13 Progressão do desenvolvimento de terapias da engenharia de tecidos para regeneração da cartilagem	59
Figura 14 <i>Matrix-induced autologous chondrocyte implantation</i> [®] (MACI [®])	60
Figura 15 Implantação do Hyalograft [®] C	63
Figura 16 Bio-Seed [®] -C	66
Figura 17 Enxerto final de traqueia imediatamente antes da implantação cirúrgica	67

Abreviaturas

HA	ácido hialurónico
RGD	ácido arginina-glicina-aspártico
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
PLA	ácido poliláctico
PGA	ácido poliglicólico
PLGA	ácido poliláctico-co-glicólico
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
PU	poliuretano
PCL	poli-ε-caprolactona
PGS	sebacato de poliglicerol
CEA	<i>cultured epitelial autografts</i>
PGA/PLA	poliglactina
PGA/PLLA	ácido poliglicólico / ácido poli-L-láctico
PET	tereftalato de polietileno
ePTFE	<i>expanded polytetrafluoroethylene</i>
FGF	factor de crescimento fibroblasto
PHB	poli – β hidroxibutirato
PLLA	ácido poli-L-láctico
ACI	implante de condrócitos autólogos
BMP-6	proteína morfogenética do osso - 6
PEG	polietilenoglicol

I. Introdução

Durante as últimas décadas, a nanotecnologia tem sido alvo de um enorme interesse por parte da comunidade científica (Shi et al., 2010, Zhang e Webster, 2009), uma vez que o rápido desenvolvimento da ciência dos materiais permitiu obter nanomateriais com propriedades biomédicas específicas (Cai e Xu, 2011). Os benefícios da nanotecnologia, em particular, a possibilidade de manipulação das propriedades dos nanomateriais, são aplicáveis em inúmeras áreas, das quais se destacam os novos sistemas terapêuticos e a engenharia de tecidos (Cai e Xu, 2011, Shi et al., 2010, Zhang e Webster, 2009).

No âmbito da nanotecnologia, os novos sistemas terapêuticos, em comparação com as formas farmacêuticas convencionais, são de enorme interesse, uma vez que possibilitam o aumento da eficácia terapêutica e minimizam os efeitos adversos (Shi et al., 2010). Além disso, a concepção de sistemas adequados permite que haja libertação das moléculas bioactivas de forma sustentada e no local pretendido (Cai e Xu, 2011).

Com o objectivo de desenvolver métodos terapêuticos alternativos para fins de regeneração tecidual, surge a engenharia de tecidos (Chiu et al., 2011, Shi et al., 2010), que poderá ser aplicável em lesões traumáticas/ ressecção oncológica, deformidades congénitas, processos degenerativos, e em doenças progressivas (Chen et al., 2010). As abordagens terapêuticas actuais, cujo transplante de tecidos/órgãos (autoenxertos, aloenxertos ou xenoenxertos) constitui o tratamento padrão, nem sempre têm resultados clínicos satisfatórios devido às limitações que apresentam (Chen et al., 2008, Shi et al., 2010).

A engenharia de tecidos é uma disciplina interdisciplinar que aplica conhecimentos de engenharia, medicina e ciências da vida, para o desenvolvimento de substitutos biológicos com o objectivo de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido (Chiu et al., 2011, Ma, 2008, Shi et al., 2010, Zhang e Webster, 2009). Na sua concepção clássica, o procedimento inclui três elementos fundamentais: (i) cultura celular, com capacidade de proliferação e diferenciação; (ii) produção do *scaffold*, sobre o qual se posiciona a cultura celular para criar um ambiente propício para a regeneração e que poderá também ser utilizado como meio de direccionamento de (iii) moléculas bioactivas, factores de crescimento e de sinalização, que estimulam o processo regenerativo (Armentano et al., 2010, Chen et al., 2008, Corona et al., 2010, Haleem e Chu, 2010, Ma, 2008).

As propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas dos diversos biomateriais utilizados na engenharia de tecidos são fulcrais para o sucesso da metodologia (Armentano et al., 2010, Ma, 2008). Os nanomateriais podem ser manipulados de forma a reproduzirem a arquitectura tridimensional da matriz extracelular nativa (Biondi et al., 2008), respeitando a complexidade e funcionalidade dos tecidos nativos (Shi et al., 2010, Zhang e Webster, 2009) e promovendo a adesão, proliferação e diferenciação celular (Biondi et al., 2008, Ma, 2008, Shi et al., 2010). Os biomateriais utilizados para a concepção de matrizes extracelulares podem ter origem sintética ou natural, devendo reunir um conjunto de requisitos, de forma a tornar a sua utilização viável, designadamente serem biocompatíveis, não imunogénicos, biodegradáveis, e não apresentarem toxicidade (Chiu et al., 2011).

Os biomateriais permitem direccionar factores bioactivos específicos, numa quantidade adequada e durante um determinado período de tempo, que estimulam e controlam a regeneração do tecido (Biondi et al., 2008). A integração das estratégias de libertação sustentada das moléculas bioactivas, de forma a corresponder às necessidades do tecido que se pretende regenerar, tornou-se uma das questões fulcrais na investigação científica (Biondi et al., 2008).

O potencial terapêutico desta abordagem desenvolvida com base na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos é inquestionável (Chen et al., 2008, Corona et al., 2010).

A avaliação dos progressos da engenharia de tecidos nas mais diversas áreas (pele, nervos, ossos, medula óssea, cartilagem, vasos sanguíneos, córnea, válvulas cardíacas e miocárdio) é francamente satisfatória (Chiu et al., 2011).

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos e disponibilizados comercialmente inúmeros substitutos funcionais e estruturais para aplicação clínica em várias áreas (Tessmar e Gopferich, 2007). Apesar dos progressos significativos obtidos pelos resultados clínicos, parece ser ainda necessário um longo percurso até que a engenharia de tecidos seja considerada uma opção terapêutica de primeira linha na prática clínica (Chen et al., 2010).

O presente projecto de graduação tem como objectivo, através da realização de uma revisão bibliográfica, evidenciar de que forma os novos sistemas terapêuticos

contribuem para a regeneração tecidual, identificando a importância dos biomateriais, assim como descrever exemplos de produtos desenvolvidos para aplicação clínica.

II. Scaffolds

Os *scaffolds* são componentes fulcrais na engenharia de tecidos (Chan e Leong, 2008, Cunha et al., 2011, Puppi et al., 2010), na medida em fornecem o suporte estrutural para a fixação e crescimento *in vivo* de células, criando um microambiente propício para a substituição ou reparação dos tecidos, e auxiliando estruturalmente o tecido recém-formado (Fig.1) (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010, Puppi et al., 2010). Em lesões extensas, é frequente a perda da matriz extracelular, pelo que é necessária a criação de uma matriz artificial, que fixe os tecidos humanos, i.e. a adesão numa fase inicial e a subsequente diferenciação celular (Chan e Leong, 2008, Huang e Fu, 2010), preservando a capacidade das células para se diferenciarem nos seus fenótipos nativos (Puppi et al., 2010). Assim, as características arquitectónicas, biológicas e físicas, químicas e mecânicas do *scaffold* que devem ser consideradas serão abordadas nas secções seguintes.

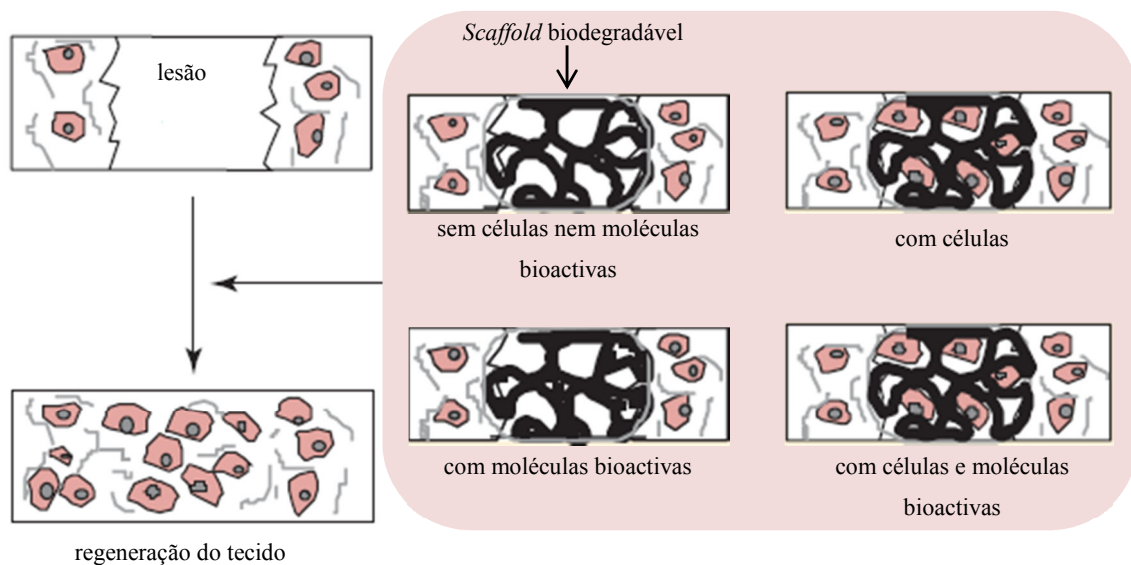


Figura 1 Uma das principais metodologias com biomateriais em engenharia de tecidos (adaptado de (Yasuhiko, 2005))

2.1 Arquitectura

A configuração do *scaffold* deve ser adequada ao tecido hospedeiro, ressaltando sempre a necessidade de garantir condições para o crescimento celular, e posterior integração no tecido nativo e propiciando a vascularização (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011).

Podem assim, ser categorizados em *scaffolds*: i) porosos, ii) hidrogel e iii) fibrosos (Chiu et al., 2011).

Um *scaffold* poroso possui uma microestrutura, que apresenta uma maior área de contacto disponível para adesão celular (Chiu et al., 2011). Deste modo, promove-se a proliferação e diferenciação celular, para além de possibilitar a penetração das células do hospedeiro e assegurar uma rápida neovascularização (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Cunha et al., 2011, Puppi et al., 2010). O diâmetro dos poros assegura um transporte eficiente de nutrientes e oxigénio para os tecidos, assim como a remoção dos metabolitos (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Cunha et al., 2011, Puppi et al., 2010). A porosidade não deve ser excessiva, a fim de não comprometer a estabilidade mecânica do *scaffold* (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Cunha et al., 2011, Puppi et al., 2010).

Os hidrogéis são constituídos por uma rede tridimensional reticulada de cadeias de polímero ligadas covalentemente que, em contacto com a água, intumescem, tornando-os biocompatíveis (Chiu et al., 2011, Van Vlierberghe et al., 2011). O polímero pode ser de origem natural, tais como a agarose, o alginato, o xiloglucano, metilcelulose, ácido hialurónico (HA), a quitosano e matrigel ou sintética, tais como os de metacrilato e polietileno glicol (Chiu et al., 2011, Van Vlierberghe et al., 2011). São estruturas versáteis, na medida em que permitem a encapsulação de células e a orientação estrutural adequada para o crescimento celular, podendo as suas propriedades serem modificadas por reticulação (Chiu et al., 2011, Van Vlierberghe et al., 2011). A organização em rede que constitui o hidrogel facilita a permeação de oxigénio e nutrientes, bem como a migração de células entre o tecido circundante e o *scaffold* (Chiu et al., 2011). A sua consistência permite ainda a sua administração por via parenteral para colmatar defeitos da forma irregular (Chiu et al., 2011).

Alguns biomateriais, tais como colagénio, elastinas, fibronectina e laminina formam *scaffolds* fibrosos, que são utilizados na engenharia de tecidos (Chiu et al., 2011, Smith e Ma, 2004). Estes mimetizam a matriz extracelular nativa na sua dimensão nanométrica e são igualmente constituídos por fibras proteicas adesivas (Chiu et al., 2011, Smith e Ma, 2004). Deste modo, a adesão e proliferação celular serão estimuladas (Chiu et al., 2011, Smith e Ma, 2004).

2.2 Biocompatibilidade

Os biomateriais utilizados na concepção dos *scaffolds* devem ser desprovidos de toxicidade, e ser compatíveis com os todos os elementos celulares, ocorrendo deste modo uma interação celular favorável à regeneração (Chan e Leong, 2008, Cunha et al., 2011). Os *scaffolds* devem ser biocompatíveis e biomiméticos, apresentando semelhanças com a matriz extracelular do tecido que se pretende substituir (Biondi et al., 2008, Chiu et al., 2011, Wang et al., 2010). Além disso, biomateriais biodegradáveis e bioreabsorvíveis minimizam o risco de inflamação (Huang e Fu, 2010, Chiu et al., 2011).

2.3 Bioactividade

Em algumas situações o tecido circundante à lesão não tem o potencial de regeneração adequado, o que coloca em questão a viabilidade do processo, na medida em que a utilização de *scaffold* apenas com funções estruturais e de orientação de células é insuficiente (Biondi et al., 2008, Huang e Fu, 2010). Assim, o direccionamento de factores bioquímicos potencialmente terapêuticos como, por exemplo, factores de crescimento, estimuladores da angiogénese, proteínas e genes (Hernández et al., 2010), entre outras moléculas bioactivas através de *scaffolds*, auxilia o processo de regeneração (Biondi et al., 2008, Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010, Puppi et al., 2010). A encapsulação dessas biomoléculas, possibilita, além do direccionamento para o local alvo, o controlo do perfil de libertação e do comportamento celular, ocorrendo deste modo actividade *in vivo* a longo prazo (Biondi et al., 2008). Além disso, proporcionam ainda protecção contra a proteólise (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Hernández et al., 2010, Puppi et al., 2010). As biomoléculas permitem também melhorar e orientar a organização e neovascularização de tecidos (Huang e Fu, 2010).

2.4 Propriedades físicas, químicas e mecânicas

As propriedades físico-químicas do *scaffold* estão dependentes da escolha dos biomateriais a utilizar, na medida em que as mesmas podem diferir dependendo do tecido a ser substituído ou reparado (Chiu et al., 2011, Cunha et al., 2011). O

biomaterial deve permitir a moldagem em diferentes geometrias, de forma a adequar-se às necessidades dos diferentes tipos de tecidos (Chiu et al., 2011). Formas de disco ou cubo são vulgarmente utilizadas na regeneração de tecido ósseo, tubular aplicada na regeneração do tecido nervoso, vascular ou regeneração da traqueia e achatada na engenharia de tecidos de pele, intestino e fígado (Chiu et al., 2011).

De uma maneira geral, os *scaffolds* devem ter resistência mecânica para poderem além de suportarem a neogénese, poderem ser manuseados durante a sua aplicação (Chiu et al., 2011). As forças de tracção que os *scaffolds* exercem sobre os elementos celulares influenciam as suas características morfológicas e adesivas (Chan e Leong, 2008). As características dos *scaffolds* quando aplicados em pediatria, devem ser configurados de forma a que alterações estruturais e biológicas ocorram, possibilitando a adaptação ao estado de desenvolvimento da criança (Chiu et al., 2011).

A degradação do *scaffold* está dependente da taxa de regeneração do tecido em desenvolvimento (Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011), não devendo contudo originar produtos de degradação que possam interferir com o tecido em crescimento ou originar um processo inflamatório (Chiu et al., 2011).

Na escolha do biomaterial a utilizar, deve ter-se ainda em consideração que há matrizes, cujas características químicas definem a sua susceptibilidade à degradação aquosa ou enzimática (Chiu et al., 2011).

2.5 Biomateriais

Os biomateriais utilizados para a concepção dos *scaffolds* destinados à engenharia de tecidos podem ser classificados em duas categorias distintas, de acordo com a sua origem: sintética ou natural (Armentano et al., 2010, Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011, Cunha et al., 2011).

A utilização de polímeros naturais na engenharia de tecidos é vantajosa devido à sua similaridade com os tecidos que se pretende regenerar (Chan e Leong, 2008, Cunha et al., 2011), uma vez que quando implantados teoricamente não desencadeiam uma resposta imune (Chen et al., 2008). A biocompatibilidade deve-se ao facto de em

compostos como colagénio e quitosano estarem presentes na matriz extracelular nativa (Chen et al., 2008, Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010). Deste modo, cria-se um ambiente propício que facilita a adesão, proliferação e diferenciação celular, para além da existência de sinalização celular específica (Armentano et al., 2010, Cunha et al., 2011), o que contribui para a regeneração do tecido (Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010).

Por outro lado, a sua utilização tem limitações devido à necessidade de um amplo protocolo de purificação (Nöth et al., 2010), juntamente com um rigoroso controlo de qualidade no processo produtivo (Straley et al., 2010). Registam-se ainda dificuldades na definição da taxa de degradação, assim como, problemas de reprodutibilidade nas propriedades químicas e biológicas dos materiais entre lotes (Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010, Straley et al., 2010). São também facilmente degradados por acção enzimática e têm propriedades mecânicas e físicas limitadas, que tentam ser ultrapassadas através da incorporação de elementos sintéticos ou processo químicos, tais como a reticulação (Armentano et al., 2010, Chan e Leong, 2008, Chiu et al., 2011). Há ainda a possibilidade da contaminação por agentes patogénicos (Cunha et al., 2011) e risco da ocorrência de reacções de imunogenicidade (Chan e Leong, 2008). Na engenharia de tecidos, o colagénio, o alginato, a gelatina, a quitosano, a fibrina, a fibronectina e os glucosaminoglicanos, onde se inclui o HA, têm sido amplamente utilizados como biomateriais (Armentano et al., 2010, Chen et al., 2008, Chiu et al., 2011,).

O colagénio é uma proteína biológica, presente na matriz extracelular de muitos tecidos (Cunha et al., 2011, Puppi et al., 2010), sendo os tipos I e III as formas mais abundantes (Chiu et al., 2011). Desempenha, por isso, um papel importante na formação dos tecidos e órgãos, nomeadamente na pele, ossos, tendões e tecido conjuntivo (Nöth et al., 2010), possuindo por isso biocompatibilidade intrínseca (Straley et al., 2010). Obtido geralmente a partir de tecidos animais, é purificado (Huang e Fu, 2010, Wang et al., 2010) podendo ser moldado em diversas formas (esponjas, matriz porosa, filmes, hidrogeles e monofilamentos) devido à versatilidade que apresenta (Cunha et al., 2011, Nöth et al., 2010,). O colagénio como possui elasticidade, alta resistência mecânica (Cunha et al., 2011), elevada afinidade com a água, reduzida citotoxicidade e possibilidade de modificação da biodegradabilidade, torna a sua utilização vantajosa na engenharia de tecidos (Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010, Puppi et al., 2010). Porém,

está associada ao risco de reacções de imunogenicidade, quando obtido de fontes não humanas (Chiu et al., 2011, Straley et al., 2010) e rapidamente é degradado após implantação (Huang e Fu, 2010, Puppi et al., 2010). A elevada taxa de degradação diminui a sua resistência mecânica (Cunha et al., 2011, Puppi et al., 2010), característica que pode ser otimizada através do processo de reticulação (Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010).

O alginato é um polissacarídeo, extraído de algas castanhas (Chen et al., 2008, Nöth et al., 2010, Straley et al., 2010). A sua gelificação apenas ocorre em meio aquoso e na presença de catiões divalentes (Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010, Nöth et al., 2010, Straley et al., 2010). A formação de um hidrogel possibilita uma encapsulação homogénea das células, assim como a veiculação de factores de crescimento (Huang e Fu, 2010, Nöth et al., 2010, Puppi et al., 2010, Wang et al., 2010). Porém, em soluções aquosas facilmente a estabilidade da molécula é afectada (Puppi et al., 2010), interferindo na actividade da proteína de adsorção e, conseqüentemente, na adesão celular (Chiu et al., 2011). Modificações através da adição de ácido arginina-glicina-aspártico (RGD) e fibronectina permitem minimizar tais efeitos. (Chiu et al., 2011). O seu uso na engenharia de tecidos é justificado devido às características inertes no interior da matriz, à dissolução e biodegradabilidade que apresenta em condições fisiológicas, sendo o seu grau de porosidade ajustável, possibilitando deste modo, elevadas taxas de difusão das moléculas (Puppi et al., 2010).

A gelatina é obtida por desnaturação do colagénio por hidrólise ácido ou alcalina, um processo designado por reticulação (Chiu et al., 2011, Nöth et al., 2010). A desnaturação a que é submetida reduz o risco de antigenicidade (Nöth et al., 2010). O ponto isoeléctrico da gelatina pode ser modificado (entre 5.0 e 9.0) (Nöth et al., 2010), de modo a torna-lo compatível com o pH fisiológico do tecido (Huang e Fu, 2010). A alteração do pH pode ainda ser favorável em interacções com biomoléculas de carga oposta, nomeadamente factores de crescimento, por exemplo *transforming growth factor beta* (TGF β) e *insulin-like growth factor* (IGF-1) e ligação a proteínas e péptidos (vitronectina, fibronectina e peptídeos RGD) (Nöth et al., 2010). A libertação das referidas moléculas parece ocorrer por degradação enzimática do veículo (Huang e Fu, 2010).

O quitosano é um polissacarídeo biodegradável, derivado da N-acetilação do biopolímero quitina, que é habitualmente encontrado no exoesqueleto de crustáceos (Chiu et al., 2011, Straley et al., 2010, Wang et al., 2010). É constituído por unidades repetitivas de $\beta(1-4)$ 2-amino-2desoxi-D-glucose, existindo ainda unidades repetitivas da molécula de N-acetil-D-glucosamina (Wang et al., 2010) que também são componentes das moléculas da matriz extracelular do organismo humano (Chiu et al., 2011). A sua similaridade estrutural com a dos glucosaminoglicanos do tecido conjuntivo (Huang e Fu, 2010) e a possibilidade de modificação das suas propriedades, variando o conteúdo do grupo acetil, justificam a sua utilização em diversas aplicações biomédicas (Chiu et al., 2011, Straley et al., 2010). Quanto maior o grau de acetilação, que interfere na carga positiva da molécula, menor o risco de desenvolvimento de um processo inflamatório, melhorando deste modo a biocompatibilidade e a adesão celular. (Chiu et al., 2011). No entanto, o quitosano possui propriedades mecânicas pouco atractivas e é insolúvel num conjunto alargado de solventes (Straley et al., 2010).

Os derivados de quitosano podem ser desenvolvidos sob a forma de estruturas porosas, nanofibras, hidrogéis e esferas, de acordo com a aplicação pretendida (Wang et al., 2010). Os hidrogéis de quitosano são termosensíveis, pelo que a exposição à temperatura corporal desencadeia a polimerização *in situ*, num curto período de tempo, assegurando a libertação dos factores bioactivos (Wang et al., 2010). Porém, o processo ainda possui algumas limitações, devido à necessidade da optimização de parâmetros de formação do gel (Wang et al., 2010).

A fibrina é um polímero de origem natural, formada por polimerização de monómeros de fibrinogénio, por acção enzimática da trombina (Chiu et al., 2011, Nöth et al., 2010, Straley et al., 2010). A sua capacidade de indução da angiogénese e promoção da adesão e proliferação celular, torna-a extremamente útil na cicatrização de feridas (Chiu et al., 2011, Huang e Fu, 2010), podendo ainda ser usada como veículos de direccionamento de células (Huang e Fu, 2010). As propriedades físicas e biomiméticas de fibrina (fibrinogénio e trombina enriquecida) fazem com que quando utilizada sob a forma de injectável, concomitantemente com os factores de crescimento que transporta (Huang e Fu, 2010), rapidamente as células transplantadas invadem a sua estrutura, substituindo-a (Huang e Fu, 2010, Nöth et al., 2010). Porém, é rapidamente degradada *in vivo*, possui uma reduzida rigidez, para além do facto de apresentar limitações na

manutenção da integridade (Huang e Fu, 2010). Fibronectina é um dos componentes da matriz extracelular, sendo responsável pela promoção da adesão celular e indução migração celular (Huang e Fu, 2010).

Os polissulfatos de glucosaminoglicanos são macromoléculas que estão presentes abundantemente na matriz extracelular, podendo ser combinados com o colagénio para formar *scaffolds* de nanofibras (Chiu et al., 2011). O HA, um glucosaminoglicano não sulfatado é responsável pela interacção com diversas moléculas (proteínas de ligação e proteoglicanos) e pela integridade estrutural de vários tecidos (Nöth et al., 2010, Straley et al., 2010, Puppi et al., 2010). Possui um elevado peso molecular e carga negativa, sendo a sua estrutura formada pela alternância entre o ácido glucurónico e a N-acetilglucosamina (Chiu et al., 2011). Os *scaffolds* de HA são fabricados habitualmente sob a forma de hidrogéis, sendo a sua estrutura reticulada conferida por reacção química com solventes (Straley et al., 2010). A sua utilização em *scaffolds* é importante para a interacção, adesão e organização celular, uma vez que contribui para o aumento da migração e proliferação de células embrionárias (Chiu et al., 2011, Puppi et al., 2010). A molécula de HA pode ser facilmente alvo de modificações químicas, nomeadamente na sua estrutura molecular (Puppi et al., 2010), com o objectivo de adequar as suas propriedades ao tecido (Chiu et al., 2011) e aumentar a resistência mecânica e melhorar a estabilidade a longo prazo (Puppi et al., 2010).

Os biomateriais sintéticos utilizados na engenharia de tecidos incluem os poliésteres alifáticos, os polímeros elastoméricos e os de natureza não polimérica (Chiu et al., 2011, Puppi et al., 2010), como as cerâmicas (Nöth et al., 2010). Estes materiais apresentam propriedades físicas e químicas previsíveis e reprodutíveis entre lotes, podendo estas ser modificadas, consoante as necessidades da aplicação biomédica, como é o caso da taxa de degradação (Armentano et al., 2010, Chan e Leong, 2008, Puppi et al., 2010). Para além disso, de uma forma geral, possuem uma maior estabilidade, boa resistência mecânica (Armentano et al., 2010) e são mais propícios para a formação de macro-/microestruturas (Nöth et al., 2010). No entanto, não possuem as características biológicas dos polímeros naturais que são referidas como potenciadoras de regeneração (Puppi et al., 2010). Podem ainda apresentar problemas de biocompatibilidade, que originam dificuldades na fixação e crescimento celular sobre a superfície do *scaffold*

(Chan e Leong, 2008) e há um risco aumentado de formação de metabolitos tóxicos (Chiu et al., 2011).

Apesar da sua natureza sintética, é possível desenvolver biomateriais biodegradáveis (Chiu et al., 2011, Puppi et al., 2010), evitando-se deste modo a realização de uma segunda cirurgia para a sua remoção (Cunha et al., 2011).

O ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e o seu co-polímero, o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) foram os primeiros poliésteres alifáticos lineares a serem utilizados na engenharia de tecidos (Armentano et al., 2010, Chiu et al., 2011, Straley et al., 2010), tendo a *Food Drug Administration* (FDA) aprovado a sua utilização em humanos (Armentano et al., 2010, Nöth et al., 2010, Puppi et al., 2010). Estes polímeros são removidos de forma natural do organismo, por hidrólise da ligação éster, pois os monómeros do ácido láctico e glicólico (Armentano et al., 2010, Chiu et al., 2011) utilizam as vias metabólicas do organismo para formar dióxido de carbono e água (Nöth et al., 2010). No entanto, uma rápida degradação *in vivo*, tem como consequência a acumulação dos referidos monómeros, de natureza ácida, que pode prejudicar o crescimento e a diferenciação celular, acompanhado de perda súbita de propriedades mecânicas e culminando numa reacção inflamatória e dano no tecido (Chiu et al., 2011, Nöth et al., 2010, Puppi et al., 2010). Deste modo, é fulcral otimizar a taxa de degradação, modificando para isso o peso inicial molecular, a cristalinidade e a razão do co-polímero (Nöth et al., 2010, Straley et al., 2010). Em alternativa, pode-se optar pela polilactona, um poliéster que possui uma taxa de degradação inferior, pelo que é indicado em aplicações a longo prazo (Chiu et al., 2011).

PGA possui um grupo metil extra, em comparação com o PLA, o que torna a molécula mais hidrofóbica e consequentemente a sua hidrólise ocorre mais lentamente (Armentano et al., 2010).

Os polímeros elastoméricos têm propriedade elástica que lhes confere a capacidade para retomarem a forma original, sem deformação após terem sido submetidos a determinada pressão, podendo ser utilizados por exemplo na regeneração do tecido cardíaco (Chiu et al., 2011). O poliuretano (PU), o poli- ϵ -caprolactona (PCL) e a fenilalanina com extensor de cadeia são exemplos de polímeros elastoméricos (Chiu et al., 2011). O PCL

possui uma natureza semi-cristalina e hidrofobicidade, que faz com que a sua degradação seja extremamente lenta, pelo que tem sido investigada a sua conjugação com poli(hidroxiácidos) (Puppi et al., 2010). Apesar de apresentarem boa capacidade de adesão celular, não originando processo inflamatório, a sua degradação origina um composto, o diisocianato, que é tóxico (Chiu et al., 2011). Por seu lado, sebacato de poliglicerol (PGS), outro polímero elastomérico, não origina produtos de degradação tóxicos (Chiu et al., 2011).

Por último, as cerâmicas, como por exemplo fosfatos e sulfatos de cálcio e vidro bioactivo, são constituídos por material inorgânico não metálico, possuindo uma estrutura cristalina (Nöth et al., 2010, Puppi et al., 2010). A elevada resistência à compressão e um tempo de degradação variável, propriedades mecânicas ainda em investigação (Puppi et al., 2010), torna as cerâmicas interessantes na engenharia de tecidos, nomeadamente para regeneração óssea e cartilagem (Nöth et al., 2010).

Com o objectivo de desenvolvimento de uma matriz que reúna as características desejáveis de dois biomateriais distintos, têm-se realizado estudos no sentido de combinação de polímeros naturais e sintéticos (Chiu et al., 2011). A síntese de um biomaterial, tendo como matérias - primas o polímero de colagénio, que proporciona um ambiente biomimético propício para o crescimento celular e um polímero sintético, por exemplo PGA, PLA ou PCL, que fornece o suporte mecânico para tal ocorrer é um exemplo (Chiu et al., 2011).

III. Pele

A pele é um invólucro dos tecidos e fluídos corporais, formando por isso uma barreira protectora contra as agressões externas (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011, Zhong et al., 2010). A pele é constituída por duas camadas distintas: a epiderme, responsável pela função barreira e na qual se localizam os queratinócitos e a derme, estruturada por uma matriz extracelular rica em colagénio, que assegura a força e resistência (MacNeil, 2007, Zhong et al., 2010). A perda da integridade da pele pela ocorrência de trauma, doença genética, ferida crónica (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011, Wood, 2011) ou até mesmo intervenções cirúrgicas pode originar incapacidade ou até mesmo a morte, quando são afectadas grandes porções da pele, que não são tratadas com êxito (Huang e Fu, 2010, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010).

O organismo, com o objectivo de reparar o dano causado, inicia a produção de novas fibras de colagénio, que são distintas das que constituem a pele normal que contorna a zona danificada (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Forma tecido cicatricial, ao invés da ocorrência da regeneração da espessura total da pele (Falanga e Faria, 2007). Consequentemente, a textura deste é distinta, sendo frequente a ocorrência do fenómeno contracção da ferida, devido à presença de miofibroblastos, que induzem o desenvolvimento de células musculares lisas, sob influência dos TGF β . (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Lesões epidérmicas superficiais afectam parcialmente a epiderme e, eventualmente a zona superficial da derme (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009), sendo que a sua cicatrização ocorre sem necessidade de intervenção cirúrgica (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). A existência de queratinócitos basais em número suficiente assegura a regeneração e continuidade da proliferação para a área danificada, para além de uma matriz extracelular capaz de assegurar a migração, proliferação e diferenciação celular (Shevchenko et al., 2009, Wood, 2011). Em caso de necessidade, folículos pilosos podem também contribuir para a regeneração celular através da reserva de células – tronco, que estão localizadas na região da protuberância folicular (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009).

Nas lesões que provocam danos mais profundos, como é o caso de queimaduras e escaldões, ocorre diminuição do número de elementos epiteliais regenerativos (Shevchenko et al., 2009). A regeneração pode ter início a partir da periferia da ferida (Groeber et al., 2011), mas normalmente exigem a aplicação do enxerto cutâneo (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011). Este é constituído por epiderme e parte da derme, assim como por células tronco de queratinócitos (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Actualmente, o tratamento padrão de lesões com espessura profunda é efectuado através de um transplante autólogo de um enxerto de pele (Groeber et al., 2011, Zhong et al., 2010). Esta abordagem não possibilita a regeneração da pele, devido à quantidade limitativa de locais promotores existentes no enxerto (Zhong et al., 2010). Um autoenxerto utiliza um dermatoma para recolher a epiderme e uma parte superficial da derme, de uma zona não danificada, colocando-se posteriormente sobre a superfície da ferida, efectuando a união entre os capilares do enxerto cutâneo e da zona limiar da afectada (Huang e Fu, 2010, MacNeil, 2007, Shevchenko et al., 2009). No entanto, esta opção possui algumas limitações tais como hospitalização prolongada, maior risco de morbidade, dor associada a todos os procedimentos cirúrgicos necessários, assim como risco de infecção devido ao uso continuado de terapia imunossupressora e antivírica (Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Além disso, há escassez de áreas doadoras em casos de lesões mais extensas (50-60% do total da área superficial corporal), (Böttcher-Haberzeth et al., 2010), acrescentando que os resultados deste tipo de tratamento a nível estético e funcional são pouco satisfatórios (Shevchenko et al., 2009), na medida em que é frequente o surgimento de cicatrizes bastante proeminentes (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Existe ainda a possibilidade da utilização de aloenxertos, aplicados temporariamente com o objectivo de prevenir a perda de líquidos e a contaminação da ferida, tendo uma acção minimizadora da dor quando incorporado em feridas profundas (Groeber et al., 2011, MacNeil, 2007). Todavia, a sua utilização é reduzida, uma vez que os bancos actuais não têm aloenxertos em quantidade suficiente para fazer face às necessidades, para além das questões éticas envolvidas e da possibilidade de reacções de rejeição imunológica (Falanga e Faria, 2007, Groeber et al., 2011).

A engenharia de tecidos surge como uma abordagem inovadora para a regeneração celular, particularmente no caso de lesões cutâneas profundas (Fig.2) (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009, Wood, 2011). Representa uma alternativa válida em termos clínicos pela possibilidade de produção de epitélio com capacidade para regenerar o local danificado, num curto período de tempo e em quantidade necessária, promovendo a cicatrização (Chiu et al., 2011, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Estes substitutos da pele incluem produtos desenvolvidos ou modificados artificialmente por qualquer meio, incluindo alterações de componentes nativos, como é o caso da derme, com a finalidade de substituir uma zona danificada (Shevchenko et al., 2009). Porém, nenhum desses substitutos de pele o são autenticamente, em comparação com os enxertos de pele (Chiu et al., 2011), sendo ainda necessário averiguar qual o grau de diferenciação mínimo necessário *in vitro*, para que ocorra regeneração (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Uma vascularização eficiente e adequada é importante para que a função da estrutura substituta esteja otimizada (Böttcher-Haberzeth et al., 2010) e que se verifique o desejado efeito clínico (Shevchenko et al., 2009). Para auxiliar a regeneração do tecido, à matriz têm sido associados factores de crescimento, que procedem em combinação com mecanismos de reparação do próprio organismo (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

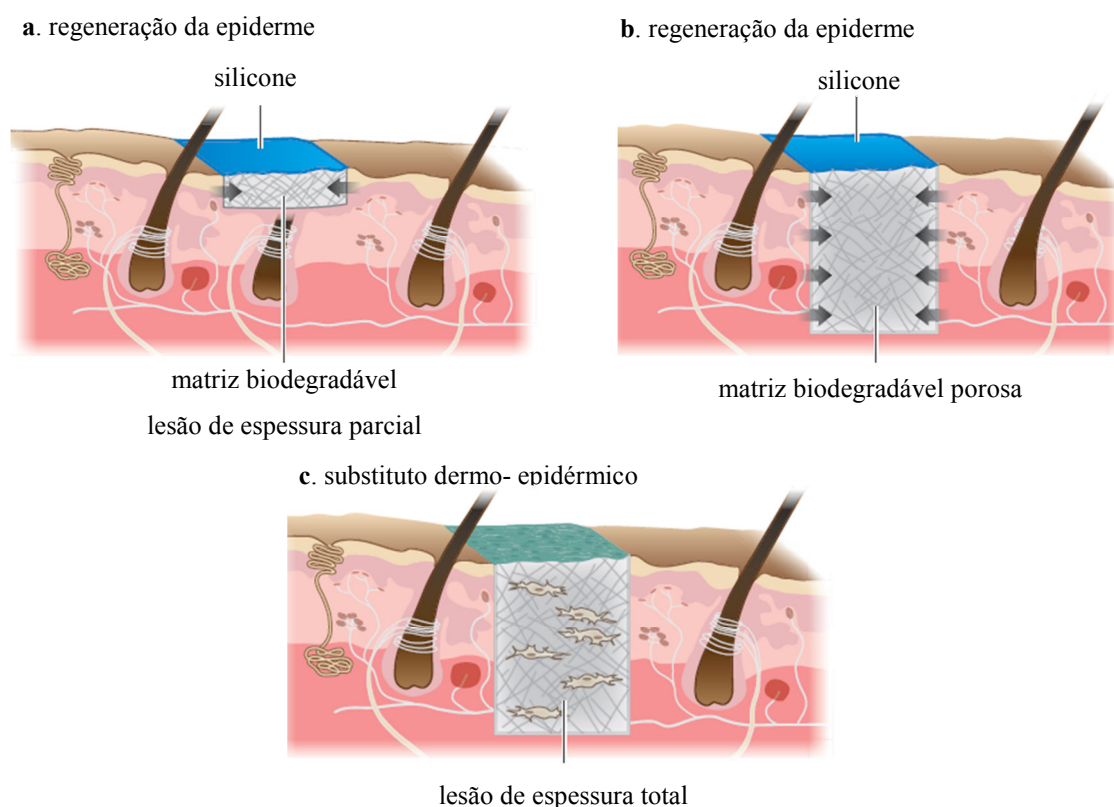


Figura 2 Abordagens actuais da engenharia de tecidos para regeneração da pele (adaptado de (Berthiaume et al., 2011))

Ao longo dos últimos trinta anos, têm ocorrido avanços significativos no âmbito da engenharia de tecidos para regeneração da pele, que culminaram no tratamento de cerca de 200 000 pacientes com produtos já disponíveis no mercado (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Falanga e Faria, 2007, Zhong et al., 2010). Alguns têm por objectivo apenas serem substitutos temporários, mas a grande maioria são para uso permanente (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). São constituídos por materiais biodegradáveis, que suportam as células (autólogas, alogénicas e xenogénicas) (Böttcher-Haberzeth et al., 2010), para além de transportarem componentes da matriz dérmica, citocinas e factores de crescimento (Groeber et al., 2011, Zhong et al., 2010). São classificados em grupos distintos, substitutos epidérmicos, dérmicos e dermo – epidérmicos, de acordo com a sua utilização (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

3.1 Substitutos da epiderme

A epiderme possui uma elevada capacidade de auto regeneração no entanto, quando as lesões afectam áreas extensas ou quando há deficiências no processo de regeneração, há necessidade de optar por substitutos epidérmicos (Falanga e Faria, 2007).

O desenvolvimento de substitutos da epiderme inicia-se com o isolamento de queratinócitos autólogos por biopsia de 2-5cm² normalmente na interface da ferida (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009). A epiderme é separada da derme e os queratinócitos são isolados por acção enzimática (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009). As células são cultivadas na presença de soro bovino fetal e outros suplementos necessários (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009), como por exemplo com fibroblastos de rato mitoticamente inactivados (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Posteriormente são colocadas em suportes, por exemplo gazes embebidas em parafina, de modo a preservar a orientação basal – apical, para formação de uma camada epidérmica estratificada (Dieckmann et al., 2010, Shevchenko et al., 2009) e facilitar a sua aplicação sobre a ferida (Shevchenko et al., 2009). A utilização de substâncias adicionais de suporte, tais como matriz de fibrina possibilita a expansão do enxerto, de modo a cobrir toda a superfície do corpo em três a quatro semanas (Shevchenko et al., 2009).

A probabilidade de sucesso da aplicação das culturas epiteliais autotransplantadas está dependente da existência de queratinócitos no término da diferenciação e da expressão das integrinas, responsáveis pela sua fixação à matriz (Shevchenko et al., 2009). Verifica-se também que a existência de camadas confluentes de células nas camadas superiores limita o acesso de nutrientes às células basais em proliferação, uma vez que formam junções desmossomais, colocando deste modo em risco a sobrevivência do enxerto (Shevchenko et al., 2009). Daí que a taxa de sucesso da aplicação deste género de substitutos varia entre 15-85% (Shevchenko et al., 2009), não sendo porém os resultados qualitativos conclusivos, devido à diversidade de métodos de aplicação (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Os substitutos da epiderme têm como desvantagens: o tempo de preparação prolongado, habitualmente de três semanas, elevados custos de produção, uma manipulação complexa e uma taxa variável de sucesso (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Os produtos que integram a categoria de substitutos da epiderme são também designados por *cultured epitelial autografts* (CEA), dos quais se destacam os exemplos comerciais Epicel[®], Epidex[™] e Myskin[™] (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009).

Epicel[®] e Epidex[™], desenvolvidos pela *Genzyme Corp.* e pela *Euroderm GmbH*, respectivamente (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009), foram os primeiros a serem comercializados, sendo particularmente úteis no tratamento de queimaduras (Dieckmann et al., 2010, Shevchenko et al., 2009). São culturas de células epiteliais obtidas através de queratinócitos autólogos (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Shevchenko et al., 2009). No caso da Epicel[®] as células derivam de uma biopsia da pele, enquanto Epidex[™] têm origem na bainha radicular externa das células dos folículos pilosos do couro cabeludo (Dieckmann et al., 2010, Shevchenko et al., 2009). Apresentam como desvantagens a diminuta viabilidade do enxerto, à qual se associa o custo elevado e o prazo de validade reduzido (24 horas) (Shevchenko et al., 2009).

Myskin[™] utiliza queratinócitos subconfluentes autólogos sobre uma membrana de suporte de ácido acrílico, com um revestimento de superfície especialmente formulado

de silicone (MacNeil, 2008, Shevchenko et al., 2009). Exige uma manipulação menos complexa, na qual as células são cultivadas num menor período de tempo, o procedimento de aplicação sobre a ferida é mais simples e tem um prazo de validade mais extenso (Shevchenko et al., 2009). Tem a particularidade de a superfície do substituto ter sido concebida de forma a permitir o desprendimento das células ocorra sem necessidade de intervenção de qualquer processo químico, físico ou enzimático (MacNeil, 2008, Shevchenko et al., 2009). Está indicado no tratamento de úlceras neuropáticas, de pressão e pé diabético, queimaduras superficiais e áreas doadores de enxerto (MacNeil, 2008, Shevchenko et al., 2009). No entanto, no tratamento de feridas de espessura total tem de ser utilizado em combinação com enxertos de pele (Shevchenko et al., 2009).

Existem ainda outros exemplos de produtos comerciais substitutos da epiderme, como é o caso do ReCell[®] (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, De Angelis et al., 2009). Na sala de operações, após realizar a biopsia para a recolha dos queratinócitos autólogos, estes são suspensos (De Angelis et al., 2009), sendo posteriormente pulverizados sobre o leito da ferida (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Apesar de se verificar uma rápida epitelização em feridas, esta abordagem está contra indicada no tratamento de queimaduras de terceiro grau (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Shevchenko et al. (2009) refere ainda outros dois exemplos comerciais que foram desenvolvidos como substitutos epidérmicos para o tratamento de queimaduras, o Laserskin[®] (Zhong et al., 2010), de nome comercial Vivoderm e o Bioseed[®]-S (Shevchenko et al., 2009). Laserskin[®] é constituído por uma membrana de HA, microperfurada por laser, a fim de possibilitar a migração das células em direcção ao leito da ferida, sobre o qual são cultivados os queratinócitos autólogos (Shevchenko et al., 2009). Os resultados preliminares têm sido promissores, pois o produto parece apresentar biocompatibilidade e reduzidas taxas de infecção (Shevchenko et al., 2009). No caso do Bioseed[®]-S os queratinócitos autólogos são suspensos em gel de fibrina, tendo já sido utilizado no tratamento de úlceras crónicas da perna de etiologia venosa resistentes à terapia padrão (Shevchenko et al., 2009).

3.2 Substitutos dérmicos

A derme possui uma capacidade de regeneração limitada, pelo que aquando da sua ausência, o tecido formado possui uma reduzida elasticidade, flexibilidade e forma irregular, em comparação com a derme nativa (Falanga e Faria, 2007).

A relevância dos substitutos dérmicos tem sido destacada em inúmeros estudos, que salientam a importância da preparação do leito da ferida, assim como da superfície que contactará com o enxerto para a promoção do crescimento de novos tecidos (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, MacNeil, 2007, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). A dinâmica dermo - epidérmica promove a reepitelização, pelo que o enxerto apresenta uma maior resistência à contracção da ferida, assim como à cicatrização (Zhong et al., 2010).

Os substitutos dérmicos desenvolvidos são na sua grande maioria acelulares, baseados em materiais alogénicos, xenogénicos ou sintéticos, sendo por isso o processo de desenvolvimento e licenciamento para uso clínico facilitado, devido à inexistência de elementos celulares (Shevchenko et al., 2009). Têm como vantagens a capacidade de produção de lotes uniformizados, em virtude de serem submetidos a um rigoroso controlo de qualidade e com custos reduzidos de produção (Shevchenko et al., 2009).

O procedimento cirúrgico é efectuado em duas etapas, aplica-se primeiro o substituto dérmico e posteriormente transplanta-se o enxerto epidérmico (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Apesar de este apresentar resultados satisfatórios a nível de cicatrização, executou-se também numa única etapa a aplicação dos dois substitutos, tendo-se utilizado uma camada dérmica de espessura menor (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Esta abordagem alternativa foi alvo de ensaios clínicos, com resultados promissores, estando restrita à região do punho e mão (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Utilizou-se Matriderm[®] como matriz dérmica (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Há uma grande variedade de exemplos de substitutos dérmicos já disponíveis comercialmente, tendo sido amplamente adoptados na prática clínica (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009). AlloDerm[®], Integra[®] e Matriderm[®] são matrizes acelulares que são aplicadas no leito da ferida de forma permanente, ocorrendo

posteriormente a colonização e a vascularização por células adjacentes (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). Após três a quatro semanas da aplicação, altura em que já se verifica uma adequada vascularização, pode-se aplicar um enxerto de pele de espessura parcial (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, MacNeil, 2008).

AlloDerm[®] (*LifeCell Corporation*) é uma matriz dérmica acelular, de estrutura porosa e fibrilar, muito similar à derme nativa, mas na qual é preservada a membrana basal (Falanga e Faria, 2007, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). É preparada após os processos de descelularização, que a torna imunologicamente inerte e liofilização (Falanga e Faria, 2007, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Tem origem num enxerto de cadáver (Falanga e Faria, 2007), sendo fácil a sua aplicação sobre a ferida (Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Tem sido utilizada, com resultados promissores, no tratamento da lesão aguda térmica (Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010) como camada superior da derme papilar (Falanga e Faria, 2007). No entanto, existem riscos de segurança e questões éticas devido ao facto de ser um biomaterial de origem humana (Shevchenko et al., 2009).

Integra[®] (*Integra Life Sciences*) é constituído por colagénio tipo I de origem bovina e condroitina - 6 - sulfato, removido do tubarão, que formam uma estrutura de natureza porosa (Fig.3) (Falanga e Faria, 2007, MacNeil, 2008, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Esta componente dérmica é recoberta por uma membrana de silicone, que para além de proteger as feridas da perda de vapor, preserva-a da contaminação microbiana (Falanga e Faria, 2007, MacNeil, 2007, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Após três semanas vai sendo sucessivamente removida, juntamente com o início da vascularização da derme e formação do tecido, podendo a ferida ser fechada permanentemente com enxertos cutâneos (Falanga e Faria, 2007, MacNeil, 2007, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Na estrutura são incorporadas diversas células do hospedeiro que contribuem para a proliferação celular, enquanto há degradação do material (Shevchenko et al., 2009). É principalmente utilizado no tratamento de feridas provocadas por queimaduras, nomeadamente lesões de espessura total (MacNeil, 2008) e de úlceras crónicas (Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Tem como principais vantagens um prazo de validade alargado, manuseamento simples, baixo risco de imunogenicidade e transmissão de doença, com resultados estéticos satisfatórios e taxas reduzidas de contracção e cicatriz (Shevchenko et al.,

2009). Porém, a sua implementação no leito da ferida só é possível em feridas não infectadas, uma vez que estas necessitam de um longo período de revascularização e é necessário um segundo procedimento cirúrgico para o fecho permanente da ferida (Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). O procedimento tem elevados custos associados (Zhong et al., 2010).

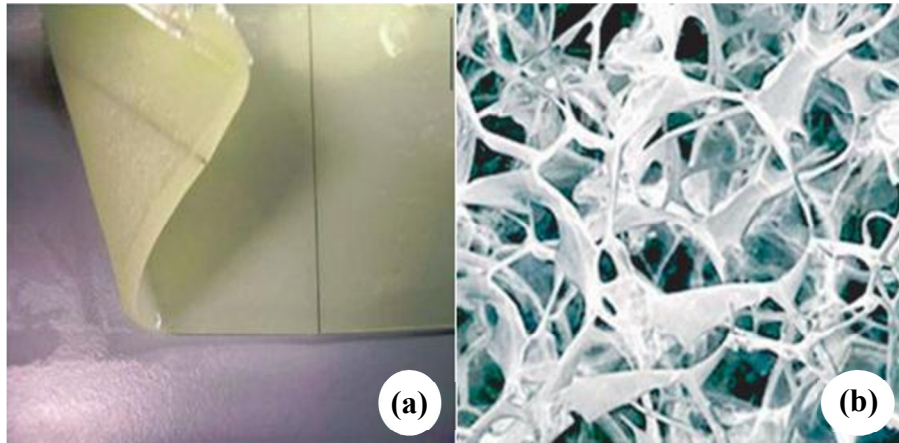


Figura 3 Integra® (a) camada de silicone (b) estrutura de colagénio – glucosaminoglicanos de natureza porosa (adaptado de (Zhong et al., 2010))

Matriderm® é constituída por uma matriz estrutural íntegra de colagénio, de origem bovina e que está revestida com um hidrolisado de elastina (Shevchenko et al., 2009). Os riscos associados a doenças virais transmissíveis (Vírus da Imunodeficiência Humana e Hepatite B) estão minimizados devido ao facto de o produto ser de origem animal (Shevchenko et al., 2009). Em feridas de espessura total provocadas por queimaduras quando aplicado conjuntamente com enxertos de pele de espessura parcial, tem demonstrado potencialidade em ensaios clínicos (Shevchenko et al., 2009).

Existem ainda substitutos dérmicos que visam estimular a cicatrização da lesão mas que são aplicados apenas temporariamente (Böttcher-Haberzeth et al., 2010). O Dermagraft® (*Advanced Tissue Sciences*) (Fig.4) é um dos exemplos, sendo formado por uma malha de poliglactina (PGA/PLA), sobre a qual se cultivam fibroblastos neonatais alogénicos (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Dieckmann et al., 2010, Zhong et al., 2010), recolhidos do tecido do prepúcio (Shevchenko et al., 2009). Estas células fornecem factores de crescimento e proteínas da matriz dérmica (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Dieckmann et al., 2010), estimulando deste modo a regeneração da camada dérmica (Shevchenko et al., 2009). O suporte é degradado por hidrólise nos vinte a

trinta dias que se sucedem à sua aplicação (Shevchenko et al., 2009), apresentando resultados promissores relativamente à reepitelização pela migração de queratinócitos (Dieckmann et al., 2010, Shevchenko et al., 2009), no tratamento úlceras venosas crónicas e do pé diabético (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Dieckmann et al., 2010, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Apresenta como desvantagens a necessidade de múltiplas aplicações, custos elevados e risco de desenvolvimento de problemas devido às células alogénicas (Shevchenko et al., 2009).

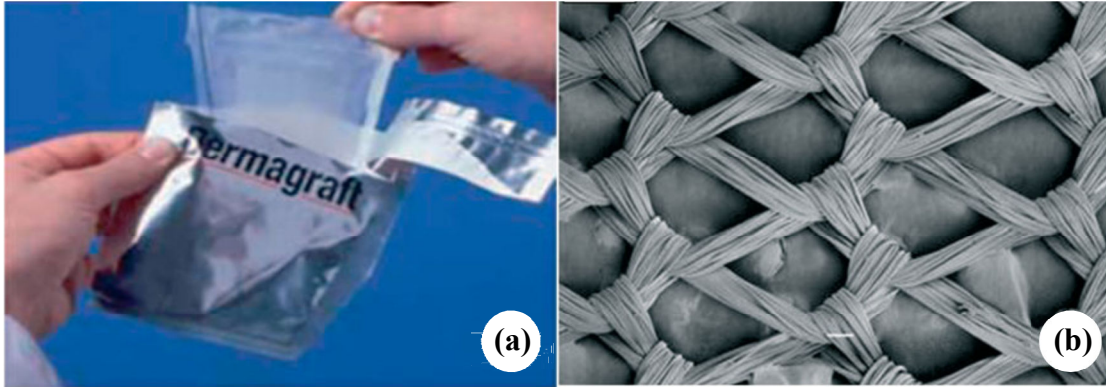


Figura 4 Dermagraft® (a) produto comercial (b) malha de poliglactina (adaptado de (Zhong et al., 2010))

3.3 Substitutos dermo - epidérmicos

Por último, a reconstrução da pele pode ser conseguida utilizando substitutos da dermo-epidérmica, nos quais células autólogas e alogénicas (queratinócitos e fibroblastos) são cultivadas em *scaffolds* (Shevchenko et al., 2009, Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011). Estes tipos de substitutos são temporários (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Groeber et al., 2011), tendo sido já utilizados no tratamento de úlceras crónicas e queimaduras, com resultados clínicos favoráveis relativamente ao fecho da ferida (Böttcher-Haberzeth et al., 2010, Dieckmann et al., 2010). Considera-se que a presença da derme diminui a contracção da ferida, fornece estabilidade mecânica e reduz o tempo necessário para a formação do tecido de granulação (Dieckmann et al., 2010). Alguns estudos constataam que há propensão para intolerância imunológica aos queratinócitos alogénicos, embora esta não seja exacerbada ao ponto de originar uma rejeição do tecido (Groeber et al., 2011, Shevchenko et al., 2009). Os estudos realizados indicam que a opção por esta abordagem parece apresentar melhores resultados clínicos no que respeita à aparência da cicatrização face às técnicas convencionais (Böttcher-Haberzeth et al., 2010).

Do grupo alargado de produtos substitutos dermo-epidérmicos disponíveis comercialmente destacam-se o Allograft[®], o Apligraf[®] e o OrCell[®].

O Allograft[®] é o substituto temporário de pele padrão podendo a sua aquisição ser efectuada nos bancos europeus de pele ou então, como produto comercial, como é o caso de Karoskin (Shevchenko et al., 2009). Durante as primeiras semanas após a lesão, na qual a resposta imune do paciente com queimaduras extensas está patologicamente suprimida pode-se utilizar um enxerto viável cadavérico, de espessura parcial para cobrir a ferida (Shevchenko et al., 2009). A rejeição do enxerto temporário sucede-se geralmente após três semanas e tem início com a vascularização, que faz com que as células epiteliais imunogénicas desencadeiem a resposta imune (Shevchenko et al., 2009). Está relatado que a sua utilização proporciona um alívio da dor (Shevchenko et al., 2009).

O Apligraf[®] (*Organogenesis Inc*) é constituído por uma cultura celular de fibroblastos alogénicos neonatais, cultivada numa matriz de gel de colagénio de bovino tipo I (Chiu et al., 2011, Dieckmann et al., 2010, Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010), com o objectivo de mimetizar a camada dérmica da pele de natureza fibrosa (Chiu et al., 2011). Sobre a superfície da camada dérmica são cultivados os queratinócitos alogénicos neonatais, de origem humana (Chiu et al., 2011, Zhong et al., 2010). É caracterizado por ser imunologicamente inerte devido à inexistência de células apresentadoras de antígenos (células de *Langerhans*, células dendríticas, células endoteliais) (Dieckmann et al., 2010). O seu uso está licenciado para o tratamento de úlceras venosas da perna e do pé diabético (Fig.5) (Chiu et al., 2011, Dieckmann et al., 2010, Falanga e Faria, 2007, Shevchenko et al., 2009), tendo-se observado vascularização e integração no leito da ferida após quinze dias, que se encaminhou para uma boa cicatrização (Zhong et al., 2010). A aplicação do Apligraf[®] em queimaduras e feridas está ainda a ser avaliada em ensaios clínicos (Chiu et al., 2011). A sua viabilidade não ultrapassa o período de um a dois meses *in vivo*, pelo que só pode ser usado como revestimento temporário da ferida, havendo necessidade por isso de se realizar um co-enxerto, com uma fonte autóloga de células epiteliais para o fecho da ferida (Shevchenko et al., 2009). Alguns autores consideram ser uma alternativa ao tradicional enxerto de pele de espessura parcial utilizado no tratamento de queimaduras (Shevchenko et al., 2009). Embora seja considerado de grande utilidade clínica tem

algumas desvantagens: custo elevado, prazo de validade reduzido, exige manipulação cuidadosa e risco de transmissão de doenças (Shevchenko et al., 2009).

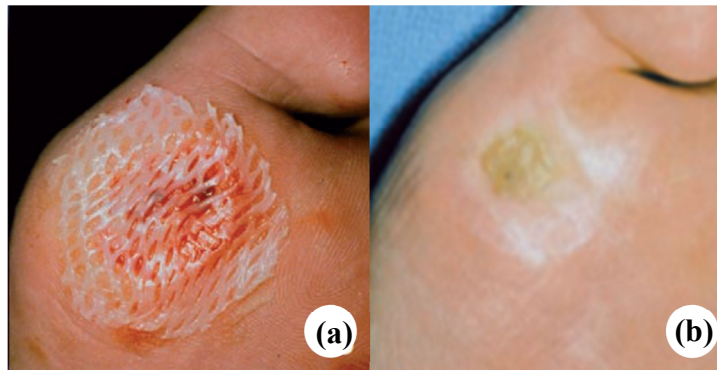


Figura 5 Úlcera do pé diabético tratada com Apligraf® (a) ferida coberta com Apligraf® (b) fecho completo da ferida após cinco semanas (adaptado de (Falanga and Faria, 2007))

O OrCell® (*Ortec International*) é um produto de bicamadas celulares, de uso temporário, constituído por uma matriz de esponja de colagénio tipo I, que possui um revestimento não poroso de gel de colagénio (Shevchenko et al., 2009, Zhong et al., 2010). Os fibroblastos alogénicos são cultivados na matriz esponjosa e os queratinócitos alogénicos são semeados no gel de colagénio (Zhong et al., 2010). A sua absorção ocorre nos sete a quatorze dias que se sucedem à aplicação, sendo usado no tratamento de queimaduras (Dieckmann et al., 2010), de epidermólise distrófica bolhosa recessiva (Shevchenko et al., 2009) e de úlceras (Dieckmann et al., 2010). Em comparação com o tratamento convencional, com a utilização do *Biobrane-L*, foi observada regeneração celular a um ritmo elevado, tendo a cicatrização sido minimizada (Zhong et al., 2010).

IV. Sistema cardiovascular

A principal causa de mortalidade e morbidade a nível mundial é a doença cardíaca (Stubbs et al., 2011, Wang et al., 2010). O envelhecimento da população será responsável pelo aumento da prevalência desta doença a longo prazo (Stubbs et al., 2011).

Durante as últimas décadas, inúmeros investigadores, recorrendo à engenharia de tecidos, têm-se centrado no desenvolvimento de abordagens terapêuticas de reparação, regeneração ou substituição de válvulas cardíacas, próteses vasculares e do miocárdio (Chen et al., 2008, Jawad et al., 2007). A aplicação deste tipo de tecnologia representa uma grande esperança na melhoria dos resultados em pacientes com doenças cardiovasculares (Naito et al., 2011).

4.1 Válvulas cardíacas

As quatro válvulas cardíacas (mitral, tricúspide, aórtica e pulmonar), posicionadas à entrada e saída dos ventrículos, asseguram o fluxo sanguíneo unidireccional do sangue (Butcher et al., 2011, Schoen, 2011).

A substituição cirúrgica de válvulas do coração ocorre quando a sua reparação já não é viável, optando-se deste modo pela utilização de válvulas mecânicas ou biológicas (Akhyari et al., 2011, Cebotari et al., 2010, Eschenhagen et al., 2007, Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Sacks et al., 2009). No entanto, a implantação de válvulas mecânicas necessita de um tratamento anticoagulante prolongado para reduzir o risco de tromboembolismo, havendo por isso risco de hemorragia, e maior susceptibilidade a infecções, enquanto as válvulas biológicas, numa utilização prolongada, são mais susceptíveis à degradação (Akhyari et al., 2011, Eschenhagen et al., 2007, Hecker e Birla, 2007, Mol et al., 2009, Schoen, 2011).

Em aproximadamente 1% dos nascimentos é diagnosticada doença congénita cardíaca, sendo que cerca de um terço destes casos envolvem deformidades nas válvulas pulmonar e aórtica (Schoen, 2011). A utilização de próteses biológicas é uma opção restrita, na medida em que estas não têm capacidade de crescimento somático, não acompanhando deste modo o desenvolvimento do paciente (Akhyari et al., 2011,

Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Mol et al., 2009, Sacks et al., 2009, Schoen, 2011). Além disso, as válvulas a utilizar em deformidades congênitas têm de ter um tamanho reduzido, o que ainda não está disponível comercialmente (Butcher et al., 2011, Sacks et al., 2009).

As válvulas cardíacas construídas por engenharia de tecidos (Fig.6) visam superar as desvantagens das próteses mecânicas e biológicas, podendo teoricamente ter as dimensões desejáveis e a capacidade de adaptação ao crescimento em pacientes pediátricos, para além da sua longevidade (Akhyari et al., 2011, Butcher et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Vesely, 2005). Poderão ainda ter um custo menos dispendioso do que as próteses actualmente disponíveis (Sacks et al., 2009), pelo que a sua utilidade clínica é extremamente promissora (Butcher et al., 2011, Mol et al., 2009). As válvulas devem reunir um conjunto de características estruturais e dinâmicas (Butcher et al., 2011, Schoen, 2011) entre as quais se incluem não obstrutivas, o fecho deve ser imediato e completo, não trombogénicas e não imunogénicas, acompanhamento do crescimento somático do paciente e por último, resistência e capacidade de regeneração a longo prazo (Butcher et al., 2011).

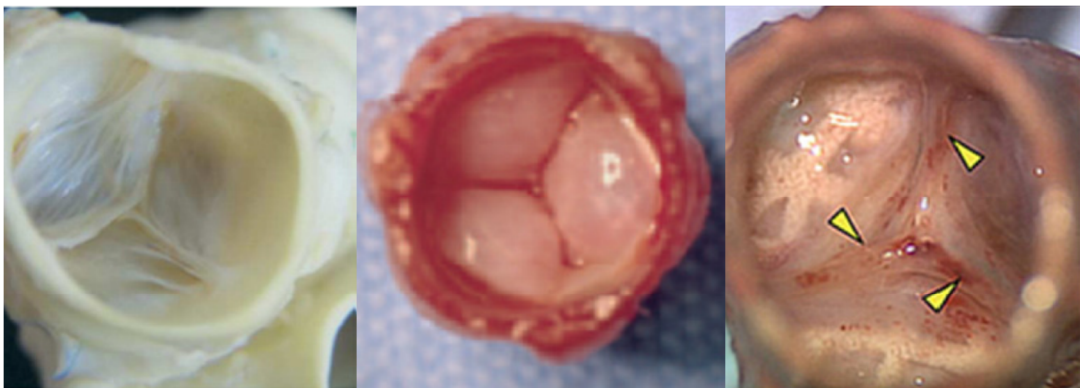


Figura 6 Válvulas cardíacas desenvolvidas pela engenharia de tecidos (adaptado de (Butcher et al., 2011))

Na engenharia de tecidos, as principais abordagens utilizadas pelos investigadores para a obtenção da cultura de tecido são: *in vitro*, cuja cultura de células é efectuada fora do corpo humano, sobre um *scaffold* biodegradável, a ser implantado *in vivo* e *in situ*, aproveitando a regeneração potencial intrínseca do organismo do paciente (Bouten et al., 2011, Mol et al., 2009, Schoen, 2011).

Na abordagem clássica *in vitro* (Fig.7), o desenvolvimento de válvulas cardíacas utiliza preferencialmente polímeros sintéticos biodegradáveis, nomeadamente PGA, PLA, poli-4-hidroxibutirato e PCL como *scaffolds* (Bouten et al., 2011, Butcher et al., 2011, Mol et al., 2009, Naito et al., 2011, Vesely, 2005). Também é viável a utilização como *scaffold* de um xenoenxerto ou de um homoenxerto (Mol et al., 2009), usualmente uma válvula pulmonar descelularizada, sendo depois recoberta por células autólogas endoteliais (Bouten et al., 2011, Cebotari et al., 2010, Chiu et al., 2011, Schoen, 2011), podendo ainda ser opção células da medula óssea e estaminais (Cebotari et al., 2010, Glotzbach et al., 2011, Mol et al., 2009). Posteriormente é colocada num bioreactor, um dispositivo que simula as condições fisiológicas e mecânicas do ambiente metabólico, durante 24 horas, para permitir a formação de tecido, e em seguida submetido a uma perfusão contínua em meio de cultura durante vinte e um dias (Bouten et al., 2011, Chiu et al., 2011, Schoen, 2011).

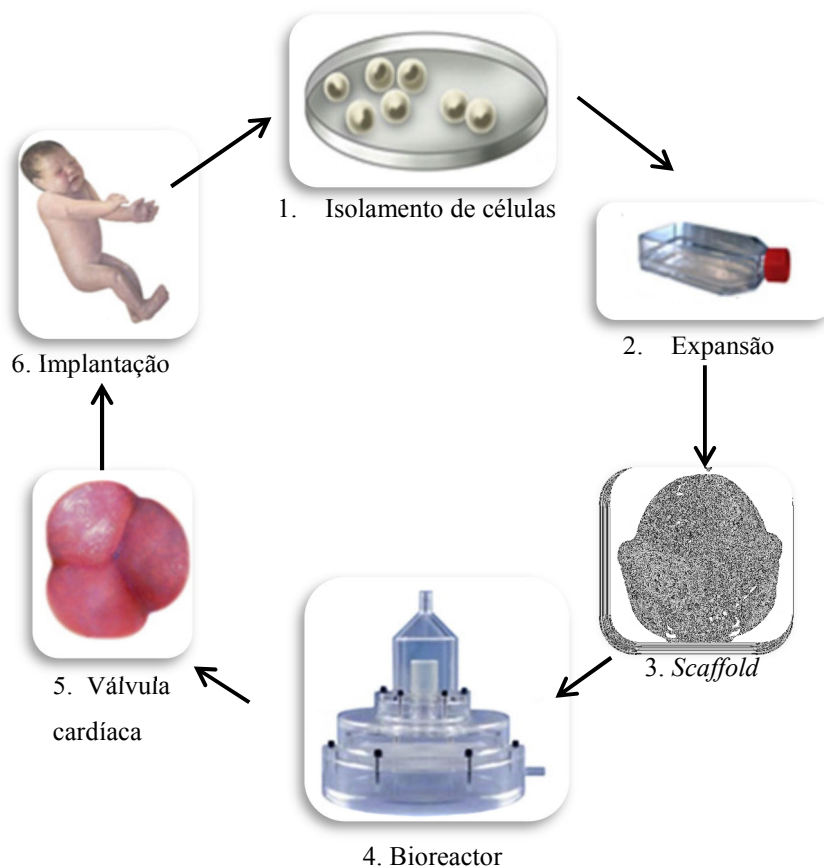


Figura 7 Desenvolvimento de válvulas cardíacas através da engenharia de tecidos (adaptado de (Weber et al., 2011))

A opção da engenharia de tecidos pela utilização de uma válvula aórtica ou pulmonar descelularizada tem potencial na medida em que após a remoção das células há manutenção da integridade estrutural e organização da matriz extracelular (Akhyari et al., 2011, Bouten et al., 2011, Butcher et al., 2011, Naito et al., 2011, Schoen, 2011). Esta opção fornece um microambiente adequado para o desenvolvimento celular, minimizando os riscos associados à presença de células xenogénicas (Chiu et al., 2011). A durabilidade dos folhetos pode ser afectada negativamente pelo processo de descelularização e há risco de suscitar uma reacção inflamatória e/ou tóxica (Akhyari et al., 2011, Butcher et al., 2011, Naito et al., 2011, Schoen, 2011). Todavia, a aplicação de válvulas explantadas em doentes pediátricos originou graves reacções inflamatórias, originando inclusive a morte de três dos quatro pacientes (Butcher et al., 2011).

A investigação conduzida por Gottlieb et al. (2010) avaliou a formação do tecido tridimensional *in vivo*, incluindo as alterações estruturais e funcionais após implantação de uma válvula pulmonar em ovinos (Gottlieb et al., 2010, Schoen, 2011). Células tronco mesenquimais da medula óssea de ovinos foram semeadas num *scaffold*, cuja constituição incluía polímeros de PLA e ácido poliglicólico/ácido poli-L-láctico (PGA/PLLA) (Gottlieb et al., 2010, Schoen, 2011). Os resultados demonstram que apesar de ter ocorrido regeneração estrutural e funcional, sem estenose *in vivo*, registou-se um agravamento da regurgitação pulmonar após seis semanas (Gottlieb et al., 2010, Schoen, 2011).

O primeiro estudo clínico em humanos foi realizado em 2006, no qual se implantou uma válvula pulmonar em dois pacientes pediátricos, tendo o seguimento pós-operatório sido efectuado durante três anos e meio (Cebotari et al., 2006, Chiu et al., 2011). A metodologia teve início com o processo de descelularização das válvulas pulmonares oriundas de um aloenxerto de cadáver, ocorrendo o crescimento e diferenciação das células progenitoras endoteliais num bioreactor e finda com a intervenção cirúrgica (Cebotari et al., 2006). Os resultados indicaram que as válvulas cardíacas apresentaram as adequadas propriedades hemodinâmicas, não havendo indícios de degeneração, diminuição de espessura ou ainda, mobilidade das cúspides, dilatação pulmonar ou estenose (Cebotari et al., 2010, Chiu et al., 2011). Para além disso, verificou-se o crescimento somático das válvulas cardíacas, acompanhando deste modo o desenvolvimento dos pacientes, o que é desejável (Chiu et al., 2011). Deste modo,

considera-se que a potencialidade e segurança da abordagem da engenharia de tecidos nesta área de aplicação estão demonstradas (Cebotari et al., 2006, Cebotari et al., 2010, Chiu et al., 2011).

A Synergraft™ desenvolvida pela *Cryolife* é de todas as abordagens para substituição de válvulas cardíacas, aquela cujo processo se encontra mais avançado a nível de prática clínica (Butcher et al., 2011, Brown et al., 2011, Vesely, 2005). A válvula cardíaca pulmonar é submetida a um protocolo de descellularização, seguindo-se um processo de criopreservação (Brown et al., 2010, Brown et al., 2011, Butcher et al., 2011, Vesely, 2005). Os resultados mostraram que a válvula teve um bom desempenho hemodinâmico, resistência à infecção e boa durabilidade (Brown et al., 2010, Brown et al., 2011, Butcher et al., 2011, Vesely, 2005). Em 2000 foi autorizada a sua introdução na Europa, sendo somente utilizado num grupo restrito de pacientes, neonatais com malformações congénitas (Vesely, 2005, Simon et al., 2003). Foram relatados em alguns pacientes complicações graves (inflamação, fibrose, deterioração), tendo alguns casos culminado em morte, factos que levaram à sua retirada do mercado (Vesely, 2005, Simon et al., 2003). Porém, sucederam-se outros estudos clínicos, nos quais foram introduzidas alterações, numa tentativa de ultrapassar as limitações que conduziram ao insucesso relatado (Vesely, 2005). Num estudo retrospectivo com trezentos e quarenta e dois pacientes realizado por Brown et al. (2010), o Synergraft™ foi considerado seguro e com bom desempenho hemodinâmico (Brown et al., 2010).

Apesar de os resultados clínicos demonstrarem a viabilidade da abordagem existem ainda alguns obstáculos técnicos antes que uma prótese para válvulas cardíacas possa estar disponível comercialmente, como opção terapêutica segura e eficaz (Cebotari et al., 2010, Schoen, 2011).

Por outro lado, a abordagem *in situ* da engenharia de tecidos é benéfica em comparação com a *in vitro*, uma vez que o processo de desenvolvimento permite que os produtos estejam acessíveis num menor período de tempo (Mol et al., 2009). As matrizes obtidas de homo ou xenoenxertos descellularizados são as mais utilizadas, promovendo a regeneração celular através das suas moléculas biológicas sinalizadoras (Mol et al., 2009). Em modelos animais, os estudos clínicos realizados demonstraram a ocorrência de regeneração do tecido (Mol et al., 2009). Em alternativa, podem-se utilizar matrizes sintéticas, que em comparação com as matrizes descellularizadas apresentam menor

risco de imunogenicidade (Mol et al., 2009). A utilização de colagénio no pré-tratamento dos *scaffolds* antes da sua implantação originou resultados promissores na regeneração das válvulas da artéria pulmonar e da aorta em modelos animais (Mol et al., 2009).

Em engenharia de tecidos *in situ*, pode-se ainda utilizar como bioreactor, a cavidade perironeal, cujo crescimento celular se deve à reacção ao corpo estranho (Mol et al., 2009). Após a formação do tecido, é removido e implantado no local onde se pretende substituir uma válvula (Mol et al., 2009). Esta abordagem já foi testada utilizando substitutos de válvulas, desenvolvidos a partir do pericárdio bovino, tendo sido posteriormente implantados em ovinos, e observado regeneração do tecido (Mol et al., 2009).

4.2 Vasos sanguíneos

A substituição de um vaso sanguíneo tem como tratamento padrão a cirurgia de derivação coronária ou periférica (*bypass*), utilizando um enxerto da artéria mamária ou da veia safena autóloga (Battiston et al., 2009, Battler et al., 2006, Chlupac et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Zhang et al., 2007). No entanto, o risco de intervenção cirúrgica invasiva, acrescido da quantidade limitada de material autólogo de enxerto e o reduzido o potencial de crescimento, torna esta opção terapêutica pouco vantajosa (Chlupac et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Naito et al., 2011). São ainda utilizados próteses vasculares sintéticos acelulares, como o Dacron[®] (fibra de polietileno tereftalato) ou o tereftalato de polietileno (PET) e ainda, o *expanded polytetrafluoroethylene* (ePTFE) (Chlupac et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Walpoth, 2010) para a substituição de vasos de grande calibre como aorta e artérias coronárias, em acessos para hemodiálise ou *bypass* arterial periférico acima do joelho (Dahl et al., 2011, Eschenhagen et al., 2007). Porém há risco de rejeição e inflamação, incapacidade de crescimento, os resultados a longo prazo são aquém do esperado, particularmente em vasos de pequeno calibre (< 6 mm), havendo ainda hipótese de ocorrência de trombose e hiperplasia (Chlupac et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, L'Heureux et al., 2006, Walpoth, 2010, Zhang et al., 2007,).

Assim, nas últimas décadas a investigação tem-se intensificado na procura de novas alternativas terapêuticas utilizando as ferramentas da engenharia de tecidos para a criação de vasos sanguíneos (L'Heureux et al., 2006, Walpoth, 2010). Para tal, surgiram quatro abordagens distintas, no que se refere à natureza de *scaffolds*: vasos sanguíneos descelularizados, de origem natural, sintéticos (biodegradáveis) e a *tissue engineering by self - assembly* (Chiu et al., 2011, Chlupac et al., 2009, Dahl et al., 2011, Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, L'Heureux et al., 2006, Peck et al., 2011, Walpoth, 2010, Zhang et al., 2007).

A descelularização dos vasos sanguíneos é vantajosa uma vez que há biocompatibilidade com o tecido e manutenção da matriz extracelular nativa, assim como das propriedades mecânicas dos vasos (Zhang et al., 2007). A utilização de vasos sanguíneos descelularizados de animais não venceu por não produzir um efeito clinicamente relevante e haver propensão para a ocorrência de aneurisma, calcificação e trombose, para além do risco de transmissão de patologias (Dahl et al., 2011, Zhang et al., 2007). Para ultrapassar tal limitação, foi utilizada a veia do cordão umbilical descelularizada como *scaffold* com potencialidade para a desejada integração celular (Zhang et al., 2007).

O gel de colagénio, um dos principais componentes da parede dos vasos sanguíneos (Zhang et al., 2007), foi utilizado para o desenvolvimento de uma prótese vascular. Weinberg e Bell (*cit. in* Kakisis et al. 2005) combinaram células musculares lisas da aorta e colagénio de natureza bovina (Kakisis et al., 2005, Zhang et al., 2007). As propriedades mecânicas do enxerto não tiveram capacidade para suportar a pressão sanguínea (Kakisis et al., 2005, Zhang et al., 2007). Os ensaios clínicos utilizando elastina como *scaffold* para substituição de vasos sanguíneos de pequeno calibre em cordeiros apresentaram resultados distintos (Zhang et al., 2007). O gel de fibrina foi também testado como *scaffold* para a concepção de substitutos vascular, tendo estes sido implantados na conexão cavopulmonar e como enxerto tubular (Chiu et al., 2011). Registou-se um adequado desempenho hemodinâmico do enxerto, não havendo necessidade de administração de anticoagulantes e não se registando nenhum episódio cardíaco adverso (trombose, estenose, obstrução do enxerto, aneurisma ou calcificação) (Chiu et al., 2011).

A utilização de polímeros biodegradáveis (copolímeros dos ácidos L-láctico, PGA e PCL) na concepção dos substitutos vasculares fornece uma matriz temporária para a regeneração do tecido, uma vez que é gradualmente substituído pelo tecido nativo (Fig.8) (Chiu et al., 2011, Chlupac et al., 2009, Walpoth, 2010). Por norma, possuem uma configuração tubular, nas quais são cultivadas as células autólogas da medula óssea, fibroblastos e endotelais (Chiu et al., 2011, Chlupac et al., 2009, Dahl et al., 2011). Na prática clínica, este tipo de enxerto vascular já se encontra aplicado em suínos e em caninos, observando-se resultados satisfatórios, nomeadamente diferenciação em células endoteliais e células musculares lisas (Chlupac et al., 2009).

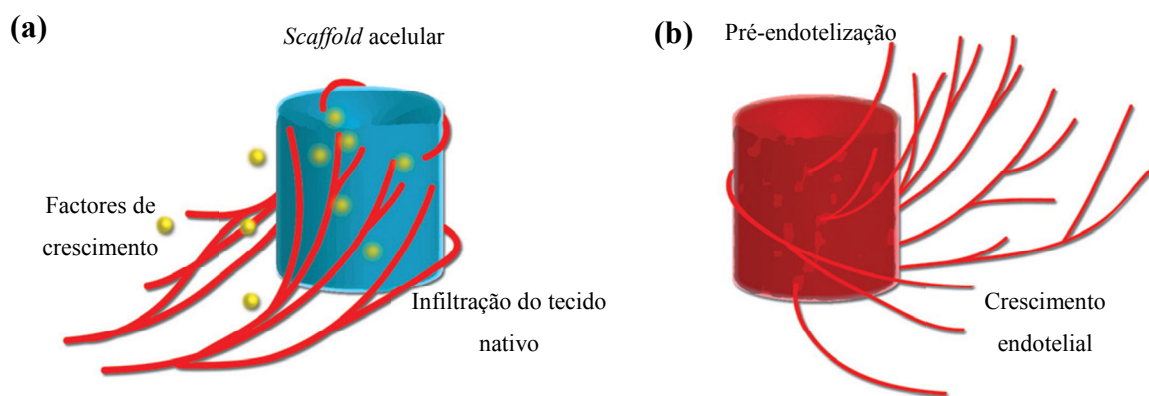


Figura 8 Utilização de *scaffolds* para regeneração dos vasos sanguíneos. (a) utilização de moléculas bioativas para impulsionar a regeneração. (b) a estrutura geométrica orienta a infiltração celular (adaptado de (Khan e Sefton, 2011))

Num outro estudo, foi utilizado um *scaffold* poroso biodegradável de ácido láctico e PCL, sobre o qual foram semeadas células autólogas, para substituir 2 cm de lesão segmentar da artéria pulmonar, cuja resolução não foi bem-sucedida numa intervenção cirúrgica (Chiu et al., 2011, Glotzbach et al., 2011). Após onze a vinte e quatro semanas observou-se evidência da presença de fibras de colagénio e elastina na parede do vaso, representando a ocorrência de regeneração tecidual (Glotzbach et al., 2011). Posteriormente, efectuou-se a aplicação desta opção terapêutica num paciente de quatro anos, cuja oclusão da artéria pulmonar, não tinha resolução cirúrgica (Glotzbach et al., 2011). Não se registaram complicações pós - operatórias, demonstrando deste modo a potencialidade do procedimento para a prática clínica (Dahl et al., 2011, Glotzbach et al., 2011). No entanto, há risco de formação óssea ou neoplasia, embora ainda tal não tenha sido observado (Chiu et al., 2011).

A *tissue engineering by self - assembly*, desenvolvida por L'Heureux et al. (2006), não utiliza *scaffolds* exógenos, sendo os fibroblastos e células musculares lisas estimuladas

para formarem a estrutura da matriz extracelular, ou seja para produzir o enxerto (Chiu et al., 2011, Chlupac et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, L'Heureux et al., 2006, Peck et al., 2011, Zhang et al., 2007). Após cerca de oito semanas de cultura, as linhas celulares são enroladas sob um suporte temporário Teflon[®], com o objectivo de obter uma estrutura tubular (Chiu et al., 2011, Glotzbach et al., 2011, L'Heureux et al., 2006, Swartz et al., 2005). Depois de um período de maturação (cerca de dez semanas), o tecido é descelularizado e o suporte removido, para a implantação das células endoteliais do paciente no lúmen (Chiu et al., 2011, Chlupac et al., 2009, L'Heureux et al., 2006). Os vasos apresentaram o desejado equilíbrio hemodinâmico (Chiu et al., 2011), propriedades mecânicas e resistência similares às dos vasos sanguíneos humanos, com capacidade para suportar pressões acima dos 2000mmHg (Chlupac et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, L'Heureux et al., 2007), completa integração tecidual, uma membrana basal íntegra, elastogénese e uma rede completa de colagénio (Glotzbach et al., 2011, L'Heureux et al., 2006). A relevância dos resultados experimentais e clínicos da implantação de um enxerto de acesso de hemodiálise em dez pacientes (Chlupac et al., 2009, L'Heureux et al., 2006, L'Heureux et al., 2007), justifica a continuação da investigação (Chiu et al., 2011).

Os resultados relevantes de um ensaio clínico que englobou a reconstrução da artéria pulmonar recorrendo à engenharia de tecidos em dez pacientes, nos quais *shunts* arterio – venosos fracassaram, influenciaram a investigação realizada pela *Cytograft Tissue Engineering* (Orlando et al., 2010, Peck et al., 2011). *Lifeline*[™] (Fig.9) foi implantado num total de vinte e cinco pacientes, com um quadro clínico variável (estágio final da doença renal, isquemia dos membros inferiores e doença coronária) (Konig et al., 2009). Numa fase inicial, a da maturação da folha base do tecido, as multicamadas de células foram envolvidas em torno de um dispositivo de forma cónica de aço inoxidável e colocadas em contacto com nutrientes, entre os quais soro fetal, gentamicina e ácido ascórbico (Konig et al., 2009, Naito et al., 2011). Posteriormente, após remoção do dispositivo, procedeu-se à desvitalização, logo seguida da cultura de células endoteliais no lúmen (Konig et al., 2009, Naito et al., 2011).

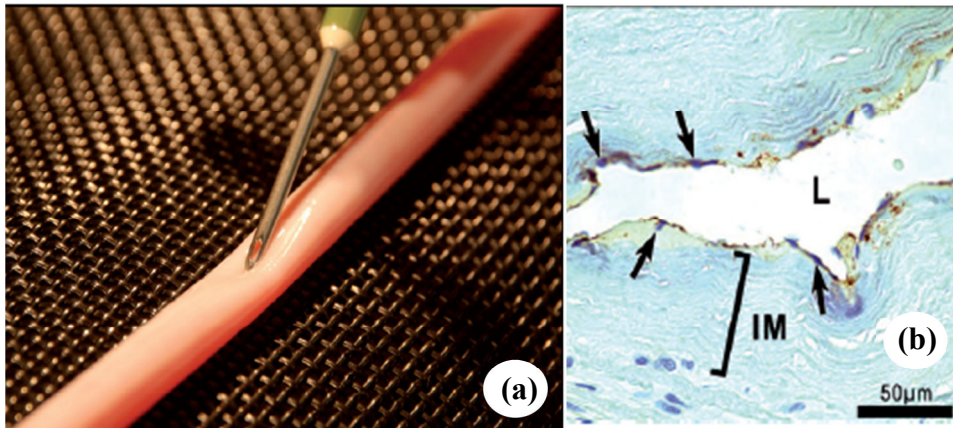


Figura 9 Lifeline™ (a) Vaso sanguíneo desenvolvido pela *tissue engineering by self – assembly* (b) Aspecto microscópico do *shunt* de Lifeline™ de um paciente, sendo possível observar células endoteliais (setas) no lúmen (adaptado de (Peck et al., 2011))

4.3 Miocárdio

O enfarte do miocárdio causa danos ao nível do tecido cardíaco, nomeadamente perda de elementos contrácteis insubstituíveis (Jawad et al., 2007, Wang et al., 2010) e insuficiência cardíaca (Wang et al., 2010). O tecido cardíaco necrótico vai sendo removido por macrófagos e substituído por tecido de granulação, originando uma cicatriz de colagénio não contráctil (Chiu et al., 2011, Jawad et al., 2007, Wang et al., 2010). A insuficiência cardíaca surge na sequência deste processo devido à dilatação do músculo da parede do ventrículo esquerdo e hipertrofia dos cardiomiócitos remanescentes, que vai-se estendendo à zona não lesada e que impede a contratabilidade do músculo (Chiu et al., 2011, Wang et al., 2010).

Em situações de insuficiência cardíaca congestiva, que constitui a manifestação terminal da maioria das patologias cardíacas, a opção terapêutica mais utilizada tem sido o transplante cardíaco (Glotzbach et al., 2011, Hecker e Birla, 2007, Wang et al., 2010). No entanto, esta opção é limitada, devido ao reduzido número de órgãos disponíveis (Hecker e Birla, 2007, Wang et al., 2010) e ao risco de complicações que podem surgir devido à supressão imunológica (Glotzbach et al., 2011, Wang et al., 2010).

As opções de tratamento disponíveis, terapias farmacológica e cirúrgica, apenas melhoram o prognóstico, mas não conseguem impedir a progressão da doença, pelo que há uma necessidade crescente no desenvolvimento de alternativas para regenerar ou

substituir o tecido cardíaco lesado (Glotzbach et al., 2011, Stubbs et al., 2011, Wang et al., 2010).

Na década de 90, procedeu-se à injeção de cardiomiócitos funcionais, assim como de células do músculo-esquelético, da medula óssea e tronco embrionárias (Cebotari et al., 2010, Glotzbach et al., 2011, Jawad et al., 2007) para o miocárdio lesado – terapia celular (Bouten et al., 2011, Chen et al., 2008, Chiu et al., 2011, Jawad et al., 2007), técnica designada por cardiomioplastia celular (Christman e Lee, 2006, Miyagawa et al., 2011). Porém, apesar de uma melhoria da função contráctil (Chen et al., 2008, Wang et al., 2010), verificou-se que ocorria uma retenção celular insatisfatória, havendo perda de aproximadamente 90% do total injectado, para além de que, 90% do total que permanecia no local pretendido entrarem em apoptose após a primeira semana (Jawad et al., 2007, Stubbs et al., 2011, Wang et al., 2010).

A engenharia de tecidos surge numa tentativa de obter progressos significativos na reparação e regeneração do miocárdio, desenvolvendo substitutos tridimensionais combinadas com vários tipos de células, que garantem uma localização precisa destas (Chen et al., 2008, Iyer et al., 2011, Jawad et al., 2007, Miyagawa et al., 2011, Stubbs et al., 2011, Wang et al., 2010). Há duas áreas em que a engenharia de tecidos pode ser particularmente relevante: na reparação de malformações congénitas em crianças e na regeneração do miocárdio lesado em casos de insuficiência cardíaca (Chiu et al., 2011, Eschenhagen et al., 2007, Iyer et al., 2011).

As principais abordagens que podem ser identificadas no âmbito da engenharia de tecidos são: utilização de um *scaffold* (Chiu et al., 2011, Christman e Lee, 2006, Iyer et al., 2011) e cultivo de linhas celulares, sem matriz (Chiu et al., 2011, Iyer et al., 2011, Jawad et al., 2008).

A engenharia de tecidos *in vitro* baseia-se na utilização de cultura de células distribuídas sobre uma matriz, ocorrendo a fase de cultura num bioreactor, em condições estáticas controladas, com objectivo de obtenção de um tecido funcional (Cebotari et al., 2010, Iyer et al., 2011). Também é possível efectuar encapsulação de células em hidrogéis (Chiu et al., 2011). Cultura de células fetais cardíacas colocadas sobre *scaffolds* porosos de alginato e *gelform* (Pfizer Inc) foram implantados no miocárdio em modelos animais

com o objectivo de averiguar a exequibilidade do procedimento (Miyagawa et al., 2011). Os resultados mostraram a ocorrência de angiogénese, assim como uma diminuição da dilatação do ventrículo esquerdo, embora não tenha havido modificações ao nível contráctil (Miyagawa et al., 2011).

Os enxertos de tecido cardíaco implantados no miocárdio lesado dos ratos, foram concebidos por mistura de cardiomiócitos de roedores neonatais combinados com colagénio, tendo sido adicionados factores da matriz (Iyer et al., 2011, Miyagawa et al., 2011, Stubbs et al., 2011). Os resultados clínicos foram peremptórios demonstrando o possível papel da engenharia de tecidos na melhoria funcional após enfarte do miocárdio (Iyer et al., 2011, Miyagawa et al., 2011, Stubbs et al., 2011). Houve formação de músculo cardíaco diferenciado, acompanhado de vascularização, integração no tecido nativo (Fig.10), para além da cessação das disfunções do miocárdio e da ocorrência de contracções sincronizadas (Miyagawa et al., 2011, Stubbs et al., 2011).

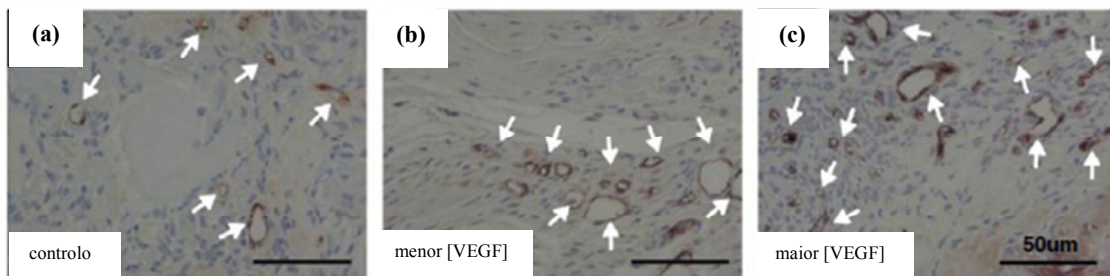


Figura 10 Implantação de *scaffolds* de colagénio (b) e (c), nos quais foram imobilizadas moléculas de factor de crescimento endotelial para regenerar uma lesão na parede ventricular de miocárdio de roedores. Crescimento tecidual comparado com controlo (a) (adaptado de (Iyer et al., 2011))

Num ensaio clínico realizado com vinte indivíduos que apresentavam cicatrizes pós- isquémicas do miocárdio, foi dispersa uma cultura de células da medula óssea sobre uma matriz de colagénio (Miyagawa et al., 2011). Os resultados foram comparados com a implantação apenas de células da medula óssea, tendo havido apenas diferenças no que respeita ao volume diastólico final do ventrículo esquerdo (Miyagawa et al., 2011). O procedimento foi considerado seguro, pelo que a realização de novos ensaios clínicos deverá ser efectuada para que possa haver uma aplicabilidade no contexto clínico (Miyagawa et al., 2011).

Há ainda necessidade de desenvolver uma alternativa ao dispositivo de assistência ventricular esquerdo, que assegure o bombeamento do sangue para o resto do corpo (Hecker e Birla, 2007). As bombas cardíacas, constituídas por uma estrutura oca, rodeada por células cardíacas contrácteis visam ser uma alternativa à acção do ventrículo esquerdo lesado (Hecker e Birla, 2007). Na sua estrutura estão também incorporados uma válvula, que controla o fluxo unidireccional e dispositivos electrónicos para o controlo do feedback (Hecker e Birla, 2007). Os sensores recebem o sinal electrónico do nó sinusal, permitindo as contracções, as quais estão sincronizadas com o coração (Hecker e Birla, 2007).

MyoCell[®], em desenvolvimento pela *Bioheart Inc*, cuja metodologia inclui um enxerto de células tronco do músculo – esquelético para o tecido lesado, encontra-se na fase II/III de desenvolvimento clínico (Haider et al., 2008). Os resultados clínicos justificam a viabilidade, segurança e eficácia do produto (Haider et al., 2008).

V. Sistema Nervoso

5.1 Nervos periféricos

Os nervos periféricos são um alvo fácil de lesões (Raimondo et al., 2011, Siemionow et al., 2010), pelo que se estima que cerca de 2.8% de pacientes vítimas de trauma, sejam afectados por este tipo de traumatismo (Gu et al., 2011, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). A incidência deste género de ferimentos é elevada em todo o mundo, afectando significativamente a qualidade de vida do paciente, podendo inclusive levar à morte (Raimondo et al., 2011).

Após uma lesão traumática, a capacidade de regeneração e plasticidade demonstrada pelo sistema nervoso periférico (Glotzbach et al., 2011, Raimondo et al., 2011), em grande parte devido à presença de células de *Schwann*, que segregam promotores de crescimento para regeneração de axónios (Johnson et al., 2005), faz com que em transecções parcial ou completa do nervo inferiores a 5mm, ocorra a reconstrução da fibra (Cunha et al., 2011, Gu et al., 2011, Siemionow et al., 2010, Straley et al., 2010). No entanto, em lesões que afectam áreas extensas, a capacidade de regeneração e recuperação funcional do organismo é insatisfatória (Raimondo et al., 2011). Assim, caso a lesão seja superior a 5 mm, o tratamento padrão consiste num enxerto de um segmento de nervo autólogo (Battiston et al., 2009, Cunha et al., 2011, Gu et al., 2011, Raimondo et al., 2011, Straley et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). Esta técnica de microcirurgia inclui a transferência de um nervo sensorial saudável de um outro local (Battiston et al., 2009, Cunha et al., 2011, Raimondo et al., 2011, Siemionow et al., 2010), havendo por isso disponibilidade limitada e risco de formação de neuromas (Cunha et al., 2011, Glotzbach et al., 2011, Gu et al., 2011). Não há garantias de recuperação funcional completa do nervo lesado (Siemionow et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007), registando-se êxito apenas em 80% dos casos (Gu et al., 2011).

Para evitar a morbidade do local dador, são já utilizadas próteses de silicone tubular, com o objectivo de colmatar a lacuna formada após lesão (Cunha et al., 2011, Raimondo et al., 2011). Apesar de não ocorrer rejeição pelo organismo, têm como desvantagens: não serem biodegradáveis, reduzida permeabilidade e a sua remoção implicar uma segunda cirurgia (Cunha et al., 2011). O colagénio tem também sido utilizado com o mesmo objectivo na reparação dos nervos periféricos de diferentes

comprimentos, com resultados satisfatórios (Gu et al., 2011). NeuroMatrix[®], Neuroflex[®] (*Collagen Matrix Inc.*) e NeuraGen[™] (*Integra Lifesciences Corp.*) são produtos que após aprovação pela FDA estão disponíveis para fins terapêuticos, (Alluin et al., 2009, Gu et al., 2011,). Na Europa, foram aprovados as próteses Neurolac[®] (*Poliganics B.V.*) de poli(DL-láctico-caprolactona), SaluBridge[®] (*Salumedica L.L.C.*) de álcool polivinílico, Neurotube[®] (*Synovis Life Technologies Inc.*) de PGA e NeuraGen[™], com indicação para lesões de nervos com tamanho inferior a 30mm (Alluin et al., 2009). O RevoNerv[®] (*Orthomed, S.A. e Biom'Up, S.A.S.*), constituído por colagénio suíno tipo I e III, ainda em fase de estudo, tem sido usado na reparação de lesões de nervos de ratos com diâmetro de 10 mm (Alluin et al., 2009, Gu et al., 2011).

Nos últimos anos, os *scaffolds* desenvolvidos aplicando princípios da engenharia de tecidos têm demonstrado uma grande potencialidade (Battiston et al., 2009, Glotzbach et al., 2011, Gu et al., 2011, Siemionow et al., 2010). Aproveitando o potencial de regeneração espontânea do nervo periférico (Battiston et al., 2009, Gu et al., 2011), produziu-se um *scaffold*, de estrutura tubular, que interliga o nervo lesado, criando um microambiente favorável à regeneração funcional e estrutural e direccionando moléculas que promovam a mesma (Cunha et al., 2011, Glotzbach et al., 2011, Gu et al., 2011, Müller-Goymann, 2004, Raimondo et al., 2011, Siemionow et al., 2010 Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). Apesar de em diversos estudos realizados em animais comprovarem a eficácia dessas moléculas promotoras na regeneração do nervo periférico, a sua introdução num protocolo de tratamento ainda não foi efectuada (Raimondo et al., 2011).

Uma vasta gama de biomateriais, com resultados clínicos similares tem sido utilizada na concepção do *scaffold*, na sua maioria materiais polímeros de natureza sintética e também tubos de natureza biológica, sendo estes últimos menos dispendiosos (Battiston et al., 2009, Cunha et al., 2011, Glotzbach et al., 2011, Johnson et al., 2005, Subramanian et al., 2009). O *scaffold* ideal a utilizar na regeneração neural deve também proporcionar condutividade eléctrica para promover o crescimento dos neuritos (Subramanian et al., 2009), tendo já sido testadas distintas abordagens, nomeadamente através de impulsos eléctricos, estímulos manuais e foto - estimulação (Raimondo et al., 2011). O seu uso clínico ainda é limitado, devido à necessidade de optimização da

resistência mecânica (Battiston et al., 2009), que minimize o risco de colapso durante a sua actividade *in vivo* (Siemionow et al., 2010).

Em modelos roedores, verificou-se que *scaffolds* de colagénio tipo I (NeuraGen™) e aloenxertos descelularizados de nervos humanos não apresentaram benefícios clínicos na regeneração do nervo periférico (Fig.11) (Glotzbach et al., 2011). Porém, num outro estudo após doze meses da implantação de uma matriz de colagénio I, num total de doze pacientes, avaliou-se a sensibilidade motora, tendo havido melhorias em quatro pacientes (Battiston et al., 2009). A utilização de outro tipo de *scaffolds*, nomeadamente membranas basais, enxertos do músculo-esquelético autólogo em formato coaxial e enxertos de veias autólogas apresentou resultados clínicos proeminentes (Battiston et al., 2009, Gu et al., 2011, Johnson et al., 2005). Um *scaffold* combinado músculo - veia tem sido utilizado experimentalmente para colmatar lacunas até 50-60 mm de danos em nervos sensorial e misto, com 85% resultados clínicos comprovados (Battiston et al., 2009, Gu et al., 2011). A utilização de um enxerto de nervo artificial está actualmente limitada a lesões no nervo inferiores a 30 mm, uma vez que se verifica degradação a longo prazo em danos de maiores dimensões (Battiston et al., 2009). Células neurais de suporte, tais como células de *Schwann*, astrócitos, linhas celulares olfactivas e células estaminais mesenquimais, juntamente com factores de crescimento (factor de crescimento neural, factor de crescimento fibroblasto (FGF), factor neurotrófico derivado cérebro, entre outros) têm sido também utilizados para promover a regeneração (Glotzbach et al., 2011, Johnson et al., 2005, Raimondo et al., 2011).

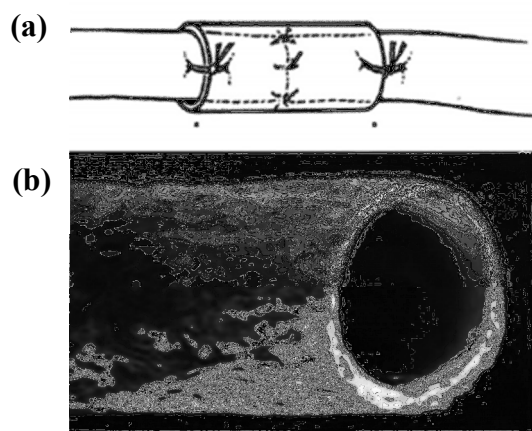


Figura 11 NeuraGen™ (a) Diagrama da estrutura (b) Imagem microscópica (adaptado de (Farole e Jamal, 2008))

Os neurónios humanos, quando adequadamente manipulados podem ser usados como fonte de células autólogas na regeneração do nervo (Glotzbach et al., 2011).

No entanto, até à data apesar de os resultados clínicos em modelos animais serem satisfatórios (Glotzbach et al., 2011), não se verificou uma recuperação completa da função do nervo (Battiston et al., 2009). Assim, é necessário que a investigação prossiga nas principais áreas afectas à regeneração do nervo periférico pela engenharia de tecidos: microcirurgia, transplante de células e tecidos, ciência dos materiais e estimulação eléctrica (Battiston et al., 2009, Gu et al., 2011), de modo a que os progressos alcançados sejam transpostos para a prática clínica (Glotzbach et al., 2011, Siemionow et al., 2010).

5.2 Medula espinhal

Os danos na medula espinhal têm início habitualmente por uma lesão primária, que desencadeia um conjunto de reacções bioquímicas e celular que provocam alterações microvasculares, edema, isquemia, necrose, peroxidação lipídica, entre outras complicações (Silva et al., 2010).

A recuperação da funcionalidade neurológica completa ocorre somente em 1% das pessoas que sofrem lesões significativas na medula espinhal (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). As lesões têm uma natureza altamente debilitante (Straley et al., 2010), resultando na sua grande maioria em paralisia parcial ou completa, para além de um comprometimento respiratório (Madigan et al., 2009, Silva et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). Após a lesão, formam-se cicatrizes gliais densas, barreiras mecânicas e químicas, que juntamente com astrócitos reactivos, glucosaminoglicanos e outras moléculas inibitórias, impedem o acesso ao local da lesão e a regeneração dos axónios (Madigan et al., 2009, Straley et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). A infiltração de neurónios saudáveis e outras células ao local lesado, nomeadamente macrófagos que auxiliam a remoção dos fragmentos da lesão, não sucede, havendo por isso perda de ligações axonais e da função motora (Straley et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007).

O tratamento clínico actual para lesões na medula espinhal é limitado devido ao ambiente inibitório complexo que se forma após traumatismo, centrando-se por isso na redução da dor e inchaço e prevenção de lesões secundárias, através de agentes farmacológicos (Silva et al., 2010, Straley et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007).

Na sequência de progressos recentes na regeneração celular e funcional da medula espinhal, houve necessidade de desenvolver uma abordagem que englobe *scaffolds* tridimensionais, transplante de células e direccionamento de moléculas bioactivas (Fig.12) (Hodgetts et al., 2009, Madigan et al., 2009, Straley et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). Transplantes de células *Schwann*, linhas celulares olfactivas e células do estroma da medula óssea têm sido utilizados, com efeitos promissores na regeneração axonal (Novikova et al., 2008). Na escolha do biomaterial do *scaffold* é importante ter em consideração a necessidade de redução da formação de cicatrizes gliais (Hodgetts et al., 2009, Madigan et al., 2009, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

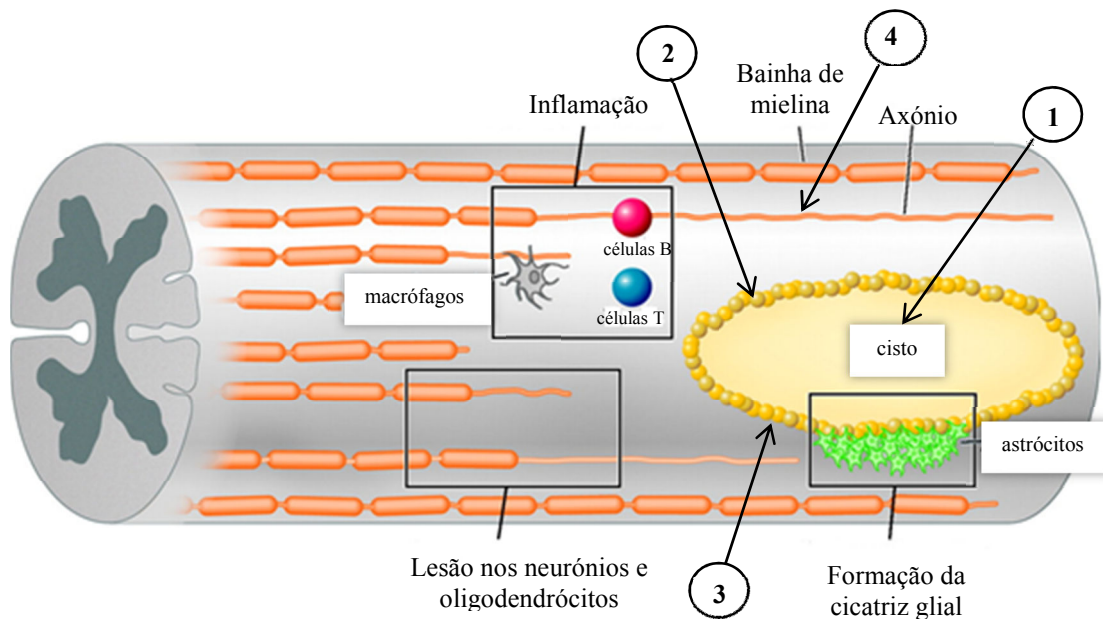


Figura 12 Principais estratégias para a regeneração da medula espinhal. (1) Prevenção de lesão secundária. (2) Eliminação do ambiente de inibição. (3) Promoção da regeneração axonal. (4) Direccionamento de axónios. (5) Criação de pontes para direccionamento de axónios. (adaptado de (Myckatyn et al., 2004, Obermair et al., 2008))

A utilização de hidrogel isoladamente pode ser considerada como opção de tratamento, na medida em que para além de efectuar o preenchimento do local da lesão, pode ser uma matriz de suporte e promover a regeneração e direccionamento de factores de crescimento (King et al., 2010, Madigan et al., 2009, Straley et al., 2010,). Têm como

grande vantagem a possibilidade de para além de poderem ser moldados na forma pretendida, ser viável a sua injeção *in situ* (Straley et al., 2010, Madigan et al., 2009), eliminando a necessidade de excisão do tecido (King et al., 2010). Em ratos adultos, foi utilizado hidrogel de alginato com o objectivo de preencher as cavidades da lesão, auxiliar a regeneração de axónios na lesão medular e transportar linhas celulares olfactivas, células de *Schwann* e células estromais da medula óssea (Chiu et al., 2011, Hodgetts et al., 2009). Num outro estudo, Silva et al. (2010) concebeu estruturas tubulares 3D a partir de uma mistura biodegradável de amido, que são complementadas na zona central com hidrogel de polissacarídeos goma gelana e que possibilitam a encapsulação da linhagem celular de oligodendrócitos (Silva et al., 2010). Os resultados preliminares *in vivo* da aplicação deste *scaffold* em modelos roedores com hemissecção indicam uma boa integração na lesão, sem registo de resposta imune (Silva et al., 2010).

King et al. (2010) experimentou uma variedade de biomateriais (colagénio, fibronectina, fibrina e β fibronectina) na regeneração axonal na medula espinhal de ratos (Hodgetts et al., 2009, King et al., 2010). Considera-se que a fibrinotectina, devido à capacidade de promoção do crescimento axonal e à compatibilidade com o tecido circundante, é um biomaterial com características mais atractivas (King et al., 2010). No entanto, o número de estudos sobre o uso de biomateriais injectáveis na regeneração da medula espinhal é extremamente reduzido (King et al., 2010).

Puchner et al. (2007) averiguaram a viabilidade de um selante comercial de fibrina (Tissucol[®]) quando injectado na lesão, tendo sido identificado uma melhoria na função locomotora, assim como revascularização e crescimento axonal (Hodgetts et al., 2009, King et al., 2010). Para além disso, foi utilizado como matriz desenvolvido *ex vivo*, o qual direcciona factores de crescimento e/ou células para o local alvo (King et al., 2010). Em modelos roedores com lesão na medula demonstrou-se que houve redução da apoptose (King et al., 2010). Têm como desvantagens o facto de ser pré-fabricado em laboratório e não se auto-agregar facilmente para a formação do gel (King et al., 2010). Assim, King et al. (2010) avaliou a biocompatibilidade, eficácia neuroprotectora e a permissividade para o crescimento axonal de um gel de fibrina/fibronectina, tendo como referência o gel de colagénio (King et al., 2010). Em contraste com este último, o gel fibrina/fibronectina apresentou boa integração com a medula espinhal e permissividade

para o crescimento axonal, podendo por isso ser considerado uma hipótese de biomaterial injectável (King et al., 2010).

Outro modelo de matriz extracelular utilizada foi o MatrigelTM, constituído por fibronectina, laminina e proteoglicanos, que quando combinado com moléculas bioactivas ou usado como *scaffold* para células, os resultados clínicos indiciam a ocorrência de regeneração axonal (Hodgetts et al., 2009, Madigan et al., 2009).

Os *scaffolds* biodegradáveis de estrutura tubular de fibras de poli – β hidroxibutirato (PHB), que são revestidos com hidrogel de alginato e sobre os quais foram cultivadas células de *Schwann* foram utilizados na reparação da medula lesionada (Novikova et al., 2008). Após quatro semanas do implante, observou-se uma boa integração no tecido nativo, tendo ocorrido infiltração de células do hospedeiro e vascularização (Novikova et al., 2008). No entanto, é ressaltado a importância da presença de moléculas da matriz extracelular (fibronectina, colagénio) para a sobrevivência celular (Novikova et al., 2008).

Os polímeros sintéticos, tais como poliésteres de PLA e PGA e o seu co-polímero PLGA foram também utilizados como *scaffolds* nos estudos para regenerar a medula espinhal (Madigan et al., 2009). O laboratório *Langer* investigou a utilização de células mesenquimatosas semeadas em *scaffolds* de PLGA, os quais foram posteriormente implantados num modelo hemisseccional de lesão da medula espinhal (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). Houve regeneração funcional, verificada através do aumento de quatro na escala de *Basso, Beattie e Bresnahan*, que avalia o comportamento locomotor, quando comparada com animais que receberam apenas infusão de células (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). O referido laboratório utilizou ainda *scaffolds* constituídos por 5/50 de PLGA e ácido poli-L-láctico (PLLA), na presença de ácido retinóico e neurotrofina-3, com objectivo de regeneração em fenótipos neuronais (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

Apesar dos desenvolvimentos recentes alcançados serem encorajadores (Straley et al., 2010), ainda é necessária uma investigação integral para que possa haver aplicação na prática clínica.

5.3 Cérebro

As estratégias de tratamento clínico de distúrbios neurológicos (acidente vascular cerebral, isquemia cerebral, traumatismo crânio-encefálico e doenças neurodegenerativas) pretendem apenas atenuar o processo de degeneração, preservar os tecidos não lesados e minimizar possíveis sintomas associados (Dalton et al., 2008, Delcroix et al., 2010, Pettikiriachchi et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). Os sintomas incluem disfunção motora, cognitiva e psicológica, tendo os tratamentos uma eficácia restrita (Pettikiriachchi et al., 2010).

O potencial da terapia celular é claro, por exemplo na substituição de tecido lesado devido a um traumatismo crânio – encefálico, direcionamento de moléculas para auxiliar o tratamento de doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson e Alzheimer) (Dalton et al., 2008, Delcroix et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007) ou como revestimento de implantes cerebrais para diminuir a inflamação (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). As abordagens preliminares utilizaram precursores fetais ou embrionários, como por exemplo as linhas celulares de neurónios (células PC12) e as células tronco neuronais, assim como xenoenxertos e células geneticamente modificadas (Dalton et al., 2008, Delcroix et al., 2010). No entanto, surgiram limitações relativamente à sobrevivência das células, à definição do seu local de acção e à viabilidade enxerto, após transplante (Delcroix et al., 2010). As células tronco adultas têm sido utilizadas como alternativa (Delcroix et al., 2010).

Apesar de o cérebro possuir limitada capacidade de regeneração (Pettikiriachchi et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007), pretende-se desenvolver uma opção eficaz para tratamento a longo prazo, que alcance a regeneração e recuperação funcional do tecido lesado (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). A terapia celular tem sido considerada uma abordagem promissora, estando a ser avaliada a sua combinação com *scaffolds* (Delcroix et al., 2010, Pettikiriachchi et al., 2010).

A regeneração do tecido cerebral constitui um desafio para a engenharia de tecidos (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). A complexidade biológica do tecido em questão (Chiu et al., 2011), a sua localização, na medida em que é fundamental preservar a integridade da barreira hemato-encefálica (Tian et al., 2005, Willerth e Sakiyama-

Elbert, 2007) e a necessidade de minimizar a morte celular e a inflamação após implantação do *scaffold* constituem os principais desafios nesta área (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). Além de que, surgem diversos obstáculos à regeneração do tecido, nomeadamente a formação de tecido cicatricial, libertação de factores inibidores do crescimento de axónios e número insuficiente de neurónios para iniciar o processo (Pettikiriachchi et al., 2010). O design do *scaffold* deve ser o mais adequado à fisiopatologia de cada quadro clínico (Pettikiriachchi et al., 2010, Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007), podendo ser associados componentes da matriz extracelular, numa abordagem biomimética (Delcroix et al., 2010).

Scaffolds constituídos por um hidrogel do copolímero de ácido hialurónico poli-D-lisina, combinado com anticorpos bloqueadores dos receptores Nogo-66, limitadores da regeneração, foram utilizados como potenciais agentes terapêuticos de lesão cerebral em ratos (Chiu et al., 2011, Pettikiriachchi et al., 2010, Tian et al., 2005). No entanto, a utilização deste tratamento na prática clínica ainda não é viável devido à necessidade de definição do modo como os anticorpos serão libertados no local de acção (Pettikiriachchi et al., 2010). Uma das opções é a utilização de uma bomba, que controla a libertação num período de tempo que se poderá estender até vários meses, sendo necessário porém a sua remoção cirúrgica (Pettikiriachchi et al., 2010).

VI. Cartilagem

O corpo humano é constituído por vários tipos de tecido cartilaginoso, podendo este ser encontrado, por exemplo, no pavilhão auditivo – cartilagem elástica, nos discos intervertebrais e menisco – cartilagem fibrosa e na caixa torácica, traqueia e brônquios - cartilagem hialina (Mauck e Burdick, 2011). A cartilagem hialina é um tecido conjuntivo, predominantemente avascular, sendo constituído por condrócitos, que estão dispersos numa densa matriz extracelular (Chung e Burdick, 2008, Wu et al., 2009). Tem como funções suportar a carga e reduzir o atrito entre as articulações em movimento (Wu et al., 2009).

O tecido cartilaginoso, quando lesionado, devido a trauma, doença degenerativa ou anomalias congénitas tem uma capacidade de regeneração limitada, uma vez que possui um ambiente físico adverso e uma natureza avascular, (Chung e Burdick, 2008, Haleem e Chu, 2010, Iwasa et al., 2009, Melrose et al., 2008, Vinatier et al., 2009a). O acesso ao local de lesão pelos condrócitos é impedido pela matriz extracelular que os rodeia, o que limita uma cicatrização espontânea (Chiang e Jiang, 2009, Hildner et al., 2011). Devido ao aumento da esperança média de vida e à epidemia da obesidade, estima-se que haja um crescimento acentuado do número de casos de osteoartrite, o que constitui um grande desafio clínico (Chung e Burdick, 2008, Haleem e Chu, 2010).

O recurso à cirurgia para regeneração funcional da cartilagem danificada tem sido recorrente nos últimos anos, embora seja um procedimento invasivo e não apresente resultados satisfatórios a longo prazo (Mauck e Burdick, 2011, Tognana et al., 2007). Entre as opções de tratamento disponíveis incluem-se: transplantes teciduais, enxertos periosteais e autólogos osteocondriais, microfracturas e implante de condrócitos autólogos (ACI) (Cascio e Sharma, 2008, Chung e Burdick, 2008, Haleem e Chu, 2010, Iwasa et al., 2009, Mauck e Burdick, 2011, Melrose et al., 2008). Num estudo prospectivo analisou-se os benefícios clínicos após onze anos contrapondo os tratamentos convencionais ao ACI, tendo com este último a lesão apresentadas melhorias significativas (Tognana et al., 2007). Porém, não houve formação da estrutura nativa da cartilagem, para além de poder ocorrer morbilidade do local dador, complicações cirúrgicas e rejeição do enxerto pelo tecido nativo, acompanhadas por um alívio sintomático temporário (Chung e Burdick, 2008, Haleem e Chu, 2010, Iwasa et al., 2009, Tognana et al., 2007).

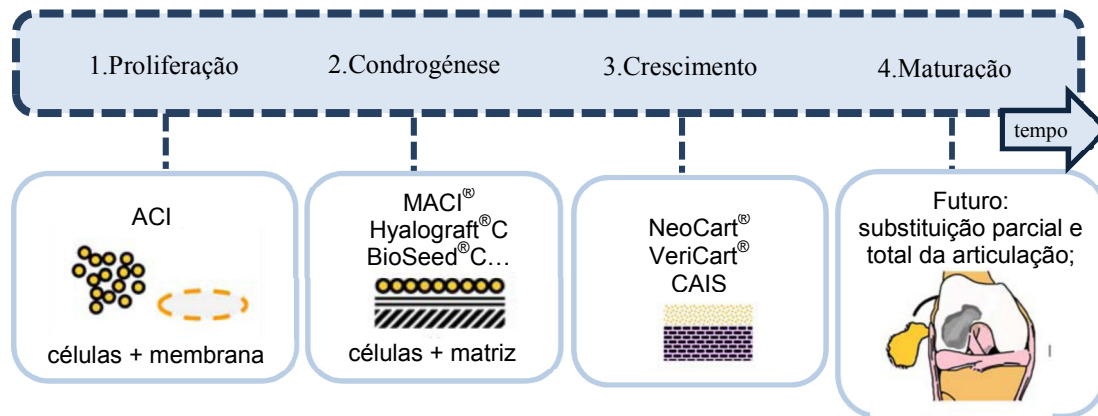


Figura 13 Progressão do desenvolvimento de terapias da engenharia de tecidos para regeneração da cartilagem (adaptado de (Harris et al., 2011, Williams et al., 2010))

A introdução de *scaffolds*, que combinados com a componente celular, formam uma abordagem alternativa, constituindo a segunda geração da técnica ACI (Harris et al., 2011, Kodali e Parker, 2010, Mauck e Burdick, 2011). Na regeneração do tecido cartilaginoso, diversos tipos de materiais têm sido utilizados como *scaffolds* (Cascio e Sharma, 2008, Mauck e Burdick, 2011, Melrose et al., 2008), sendo particularmente importante, que auxiliem na viabilidade do enxerto ao limitar a invasão por fibroblastos, o que resultaria num processo de reparação fibroso (Iwasa et al., 2009).

O colagénio tipo I e II são referidos na literatura como tendo capacidade biológica de promover a interacção dos condrócitos com o *scaffold* (Chung e Burdick, 2008). *Scaffolds* de colagénio tipo I foram testados no tratamento de lesões na cartilagem de coelhos, tendo-se observado formação de novo tecido após seis meses e organização tecidual pretendida, após doze meses (Chung e Burdick, 2008). Porém, o procedimento ainda tem limitações, nomeadamente no direccionamento da matriz para o local pretendido, a ancoragem do substituto no tecido nativo, a uniformidade da disposição da cultura sobre o *scaffold* e a ocorrência de achamento das células e consequente obstrução dos poros (Mauck e Burdick, 2011).

A Matrix-induced autologous chondrocyte implantation[®] (MACI[®]) (*Verigen*) (Fig.14) (Harris et al., 2011, Kodali e Parker, 2010, Mauck e Burdick, 2011), usada na prática clínica desde 1999 (Cascio e Sharma, 2008) utiliza o colagénio tipo I e III de natureza suína como *scaffold* (Harris et al., 2011). Foi avaliada a acção regeneradora na microfractura, em ovinos, dos condrócitos autólogos semeados sobre a matriz de colagénio (Iwasa et al., 2009). Os resultados obtidos após a aplicação de uma matriz MACI[®] em doze pacientes foram significativos, na medida em que se detectou um

grande número de células viáveis, distribuídas de forma homogênea e com a expressão fenotípica correcta (Iwasa et al., 2009). A densidade celular ($4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$) é fulcral para a manutenção do fenótipo pretendido para a diferenciação (Melrose et al., 2008). Em relação à técnica de ACI convencional, embora ambas apresentem eficácia clínica similar, tem a vantagem de promover a localização dos condrócitos junto ao local de lesão e poder eliminar a necessidade de enxertos periósteos (Iwasa et al., 2009, Mauck e Burdick, 2011, Melrose et al., 2008). Porém, a MACI[®] ainda apresenta limitações ao nível da distribuição da componente celular no *scaffold*, volatilidade dos fenótipos dos condrócitos (Iwasa et al., 2009), para além de que apenas lesões em pacientes até cinquenta anos podem ser tratadas (Hildner et al., 2011). A combinação do MACI[®] com outros procedimentos, como é o caso do *High Tibial Osteotomy* possibilitou melhorias nos critérios de avaliação do estado de lesão do joelho, podendo ser uma opção alternativa (Bauer et al., 2011).

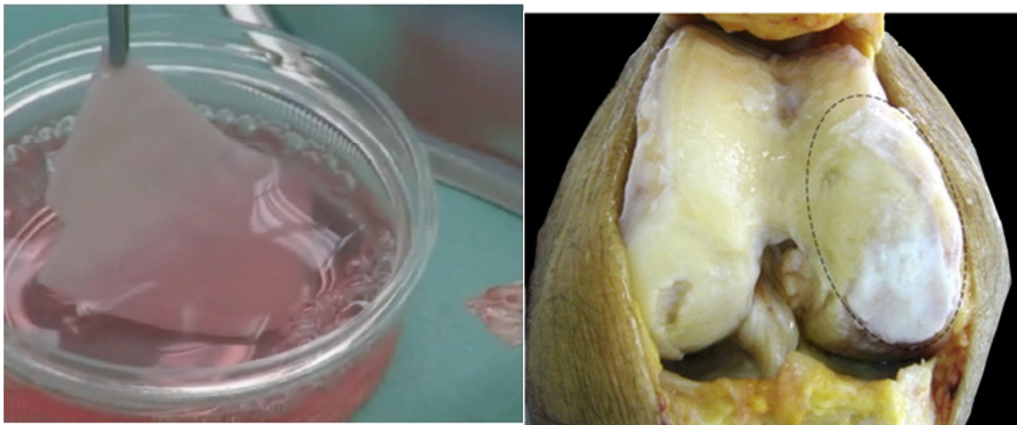


Figura 14 *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation*[®] (MACI[®]) (a) antes da implantação (b) aspecto macroscópico do enxerto (adaptado de (De Bie, 2007, Bauer et al., 2011))

A CaRes[®] (*ArthroCare Kinetics*) que utiliza uma matriz de colagénio tipo I para o cultivo celular *in vitro* (Harris et al., 2011), está em fase I dos estudos clínicos (Kodali e Parker, 2010).

Os hidrogéis poderão ser uma das opções mais promissoras na regeneração da cartilagem articular (Chung e Burdick, 2008, Mauck e Burdick, 2011). Os resultados experimentais referem que a matriz extracelular produzida se mantém sobre o hidrogel de forma mais pronunciada, o que é essencial para o rápido desenvolvimento de uma

neo-cartilagem com propriedades funcionais (Mauck e Burdick, 2011). Possuem ainda um elevado teor de água que é semelhante à existente no ambiente nativo da cartilagem (Vinatier et al., 2009b), para além de que a distribuição dos condrócitos é mais uniforme, apresentando estes uma forma arredonda e o fenótipo adequado para a diferenciação (Mauck e Burdick, 2011).

O elevado número de células presentes no início do processo de regeneração é determinante para o desenvolvimento de uma matriz extracelular num curto período de tempo e de forma pronunciada, assim como a inclusão de factores de crescimento anabólicos (IGF-1, TGF e FGF) (Mauck e Burdick, 2011, Melrose et al., 2008). Num estudo envolvendo modelos animais, optou-se por um hidrogel, com o objectivo de interligar a camada de células mesenquimatosas e a base de trabecular de metal (Mauck e Burdick, 2011). Observou-se crescimento ósseo a um ritmo satisfatório, não tendo sido porém avaliadas as propriedades da cartilagem (Mauck e Burdick, 2011). Há necessidade de melhorar as propriedades mecânicas da membrana cartilaginosa e de averiguar se a junção desta à base trabecular de metal, deve ser efectuada antes ou depois da implantação *in vivo* (Mauck e Burdick, 2011).

A viabilidade da utilização de hidrogéis de alginato, fibrina e agarose na regeneração da cartilagem foi averiguada tendo os resultados sido bastante promissores (Hildner et al., 2011). *Scaffolds* de hidrogel de alginato, nos quais foram aprisionadas células mesenquimais foram direccionados para a lesão, tendo havido produção de matriz de cartilagem similar à nativa, após indução por factores de crescimento (TGF β 1 ou proteína morfogenética do osso - 6 (BMP-6)) (Hildner et al., 2011). Por seu lado, a utilização do gel de agarose, possibilita o ajuste das suas propriedades ao microambiente em redor, promovendo o desenvolvimento da matriz extracelular (Chung e Burdick, 2008, Mauck e Burdick, 2011). Em ambas as situações, a morfologia celular observada assemelhou-se à dos condrócitos nativos (Hildner et al., 2011). Porém, a utilização destes biomateriais é limitada pela reduzida biodegradabilidade da agarose e pelo risco de reacção imunológica do alginato (Hildner et al., 2011).

Cartipatch[®] (*TBF Genie Tissulaire*) é uma matriz de hidrogel híbrido, constituído por agarose e alginato, sobre a qual são semeados condrócitos autólogos, com o objectivo de estimular a regeneração da cartilagem hialina (Haleem e Chu, 2010, Vinatier et al.,

2009a). Decorridos dois anos após implantação em pacientes humanos, os resultados clínicos apontam para uma melhoria clínica em oito dos treze pacientes, sendo observável a formação de cartilagem (Vinatier et al., 2009a).

Um peptídeo mimético de colagénio foi incorporado num *scaffold* de hidrogel de polietilenoglicol (PEG) através de ligações cruzadas (Chung e Burdick, 2008). Os resultados clínicos, quando utilizado na regeneração da cartilagem, mostram uma diminuição da difusão do colagénio exógeno tipo I, em contraposto com um aumento da produção da matriz extracelular pelos condrócitos encapsulados (Chung e Burdick, 2008).

O HA tem também sido utilizado na regeneração da cartilagem como *scaffold* bioactivo (Chung e Burdick, 2008, Iwasa et al., 2009, Melrose et al., 2008, Tognana et al., 2007), uma vez que tem intervenção em diversos processos celulares (Tognana et al., 2007), nomeadamente na promoção da ligação do sulfato de queratina e do sulfato de condroitina, que por sua vez são importantes na formação da cartilagem (Chung e Burdick, 2008). Células tronco foram semeadas sobre hidrogéis de gelatina – HA, com o objectivo de regenerarem lesões no tecido cartilaginoso em coelhos (Chung e Burdick, 2008). Os resultados obtidos demonstraram uma cartilagem elástica, firme e translúcida, com a arquitectura pretendida, tendo ocorrido integração no tecido nativo (Chung e Burdick, 2008). Os condrócitos, quando cultivados sob *scaffolds* de HA são capazes de recuperar as suas características morfológicas, assim como a sua função biológica (Haleem e Chu, 2010). Porém, os produtos de degradação do HA podem causar a lise dos condrócitos (Haleem e Chu, 2010).

Hyalograft[®] C, desenvolvido pela *Fidia Advanced Biopolymers* (Cascio e Sharma, 2008, Chiu et al., 2011, Tognana et al., 2007), é utilizado no tratamento de malformações da cartilagem, tendo a grande maioria dos ensaios clínicos sido realizados em lesões localizadas no joelho (Fig.15) (Chiu et al., 2011). A aprovação pela FDA possibilitou o seu uso com sucesso em mais de três mil e seiscentos pacientes (Weidenbecher et al., 2007). É constituído por HYAFF 111, um éster benzílico do HA na sua configuração 3D, que é mais estável que o seu precursor (Tognana et al., 2007), sobre o qual são cultivados condrócitos autólogos, obtidos de uma zona não lesada do joelho (Cascio e Sharma, 2008, Chiu et al., 2011, Domayer et al., 2007, Vinatier et al.,

2009b). Após a colheita por biópsia, as células são colocadas em cultura *in vitro*, durante três semanas e somente posteriormente semeadas no *scaffold*, cuja cultura se prolonga por quatorze dias (Cascio e Sharma, 2008, Chiu et al., 2011, Tognana et al., 2007). A implantação no local da lesão é efectuada por mino-artrotomia ou artroscopia (Chiu et al., 2011). Em 1999 foi realizado o primeiro ensaio clínico nível III, através do seguimento de cento e quarenta e um pacientes durante três anos (Cascio e Sharma, 2008, Chiu et al., 2011,). Verificou-se uma melhoria da funcionalidade e da qualidade de vida para 95,7% dos pacientes, nomeadamente alívio sintomático (Cascio e Sharma, 2008, Chiu et al., 2011, Tognana et al., 2007) Porém, registaram-se algumas complicações cirúrgicas em alguns pacientes, que rapidamente foram solucionadas e em lesões mais graves, a aplicação do enxerto demonstrou ser uma opção de tratamento inadequada (Chiu et al., 2011). Domayer et al. (2007) avaliaram a eficácia do Hyalograft® C em cinquenta e três pacientes com lesões no joelho (Domayer et al., 2007). Após cinco anos de seguimento dos pacientes, observou-se a formação de tecido de reparação *in situ* e uma integração completa na cartilagem nativa em todos os casos (Domayer et al., 2007). Em 2007, testou-se a viabilidade da utilização do Hyalograft® C na regeneração laringotraqueal de lesões em coelhos, tendo no entanto os resultados relato uma rejeição do enxerto (Weidenbecher et al., 2007).



Figura 15 Implantação do Hyalograft® C (adaptado de (Iwasa et al., 2009))

Um dos principais componentes da cartilagem, o sulfato de condroitina, após fotopolimerização adquire características de viscosidade similares ao hidrogel, podendo ser utilizada como *scaffold* (Chung e Burdick, 2008). A sua degradação ocorre *in vivo* por acção da condroitinase ABC, o que o torna um biomaterial biodegradável (Chung e

Burdick, 2008). A co-polimerização do PEG aumenta o tamanho do poro e a possibilidade de veicular células encapsuladas (Chung e Burdick, 2008).

O plasma enriquecido por plaquetas é um biomaterial injectável com um baixo risco de reacção imunológica uma vez que é obtido do plasma sanguíneo humano (Haleem e Chu, 2010, Wu et al., 2009). Possui factores de crescimento autólogos, cuja libertação ocorre de forma sustentada (Haleem e Chu, 2010) que estimulam condrogénese (Wu et al., 2009). Quando em contacto com a trombina, coagula e forma um hidrogel, obtendo-se um suporte tridimensional para crescimento celular (Wu et al., 2009). A implantação realiza-se através de artroscopia, sendo por isso um procedimento micro-invasivo e simples (Wu et al., 2009). Porém, estruturalmente ainda tem algumas limitações (Haleem e Chu, 2010). Estudos realizados em coelhos que padeciam de defeitos osteocondrais apresentaram uma melhoria na cicatrização (Kodali e Parker, 2010).

Implantes constituídos por uma monocamada de células de cartilagem ou uma camada sinovial dispostas sobre uma base de trabecular metal, um biomaterial poroso, que é similar em estrutura e funcionalmente ao osso trabecular, têm também sido utilizados em diversos estudos clínicos (Mauck e Burdick, 2011). Porém, alguns estudos demonstram limitações na estabilidade dimensional da camada de células (Mauck e Burdick, 2011).

Os *scaffolds* sintéticos têm também sido opção na regeneração da cartilagem (Haleem e Chu, 2010). Plug Truefit[®] (*OsteoBiologics, Smith e Nephew, Andover, MA*) é um polímero constituído pela combinação do ácido glicólico, um poli bifásico (D,L ácido láctico) e sulfato de cálcio (Haleem e Chu, 2010). A sua reabsorção pelo organismo é acompanhada de remodelação e substituição pelos tecidos moles e ósseo (Haleem e Chu, 2010). Chondromimetic[®], de natureza porosa, constituído por fosfato de cálcio, colagénio e glucosaminoglicanos, o hidrogel de álcool polivinílico e os cilindros de poliuretano bifásico são *scaffolds* sintéticos que também têm sido utilizados na regeneração da cartilagem (Haleem e Chu, 2010).

Scaffolds de PLGA e PLA, sobre os quais foram cultivadas células do núcleo pulposo e do anel fibroso do disco intervertebral foram já testados em modelos animal, tendo os resultados clínicos expressado a sua viabilidade como opção terapêutica (Melrose et al.,

2008). Num outro estudo clínico envolvendo coelhos, utilizou-se um *scaffold* de PGA, cujas moléculas foram reticuladas com PLGA, e sobre o qual foram semeadas células autólogas isoladas do menisco, expandidas *in vitro* (Melrose et al., 2008). Ao longo das trinta e seis semanas após a implantação foi evidente a formação do menisco, podendo-se observar após dez semanas a formação de fibrocartilagem e colagénio tipo I e II e proteoglicanos, similares ao conteúdo da nativa (Melrose et al., 2008). Porém, alguns dos materiais referidos têm desvantagens, nomeadamente défice de porosidade o que dificulta a integração dos tecidos e o seu alongamento, e podem originar subprodutos tóxicos, devido a alterações de pH, provocando inflamação e morte celular (Haleem e Chu, 2010).

Desenvolvido pela *BioTissue Technologies, Germany*, o Bio-Seed[®]-C é um *scaffold* de polímeros bioreabsorvíveis (PGA, PLA e polidioxanona), no qual os condrócitos autólogos são incorporados em gel de fibrina, que assegura a sua imobilização e protecção (Fig.16) (Iwasa et al., 2009, Kreuz et al., 2011, Ossendorf et al., 2007, Vinatier et al., 2009b). Apesar de a sua implantação requerer um procedimento cirúrgico de incisão com riscos associados, ocorreu formação de cartilagem hialina (Vinatier et al., 2009b). Ossendorf et al., (2007) realizou um estudo prospectivo no qual avaliou o BioSeed[®]-C como opção de tratamento eficaz para lesões de cartilagem pós – traumática e/ou degenerativa (Ossendorf et al., 2007). Nos dois anos que se seguiram à implantação foi efectuado o seguimento clínico dos quarenta pacientes, tendo havido uma boa integração do enxerto e formação do tecido de reparação (Ossendorf et al., 2007). Os pacientes relataram uma melhoria da qualidade de vida, assim como uma redução significativa da dor associada à lesão (Ossendorf et al., 2007). Num outro estudo prospectivo, concluiu-se que o BioSeed[®]-C representa uma opção válida no tratamento de lesões degenerativas do joelho, quando comparado com o ACI (Erggelet et al., 2010). Durante quatro anos foi analisada a evolução clínica da implantação do BioSeed[®]-C em cinquenta e dois pacientes com lesão de cartilagem de espessura total no joelho (Kreuz et al., 2011). Foi considerada uma opção terapêutica promissora (Kreuz et al., 2011). Os autores realçaram a importância da reabilitação da força muscular para uma recuperação plena (Kreuz et al., 2011).

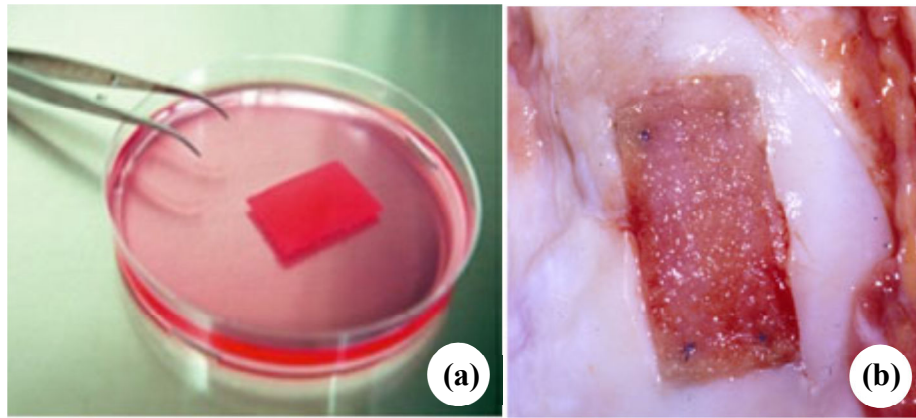


Figura 16 Bio-Seed[®]-C (a) Aspecto macroscópico (b) Implantação do enxerto (adaptado de (Erggelet et al., 2010))

Os produtos NeoCart[®], VeriCart[®] e CAIS[®], estes últimos ainda em desenvolvimento constituem a terceira geração da técnica ACI, que difere das primeiras por utilizar um *scaffold* tridimensional (Harris et al., 2011).

O NeoCart[®], desenvolvido pela *Histogenics Corporation*, é uma matriz tridimensional de colagénio tipo I bovino, na qual são semeados condrócitos autólogos (Cascio e Sharma, 2008, Crawford et al., 2009, Haleem e Chu, 2010, Harris et al., 2011), com um procedimento prévio de expansão de células *ex vivo* (Kodali e Parker, 2010). Num bioreactor hidrostático são submetidas a elevadas pressões, durante um período mínimo de sete dias (Kodali e Parker, 2010), a fim de simular a compressão natural presente na cartilagem quando há sustentação de peso (Cascio e Sharma, 2008, Haleem e Chu, 2010). Possui propriedades bioadesivas, devido à presença do colagénio / PEG, que garantem a fixação do implante, protegem a matriz na lesão da cartilagem e eliminam a necessidade de sutura (Cascio e Sharma, 2008, Haleem e Chu, 2010). Ensaio pré-clínicos realizados, com o objectivo de avaliar a eficácia da Neocart[®] na resolução da lesão na cartilagem, inclusive numa lesão de espessura total do fémur de suínos, demonstraram a ocorrência de regeneração (Crawford et al., 2009). Num outro estudo clínico, no período compreendido entre doze a vinte e quatro meses após o início do tratamento ocorreu uma redução significativa da dor, acompanhada de uma melhoria na função e movimento (Crawford et al., 2009). A análise por ressonância magnética indicou que o implante se encontrava integrado na estrutura nativa, observando-se um crescimento progressivo e organizado da cartilagem (Crawford et al., 2009). Os resultados referentes à fase I dos ensaios clínicos mostram que em 87,5% dos indivíduos submetidos a este procedimento apresentam um bom preenchimento celular

após doze meses, face a apenas 50% cuja opção terapêutico foi a microfractura (Cascio e Sharma, 2008). Os ensaios clínicos prosseguiram para a fase II (Cascio e Sharma, 2008).

O primeiro transplante de traqueia, desenvolvida com recurso às estratégias da engenharia de tecidos, foi efectuado em 2008 num paciente com um quadro clínico de infiltração tuberculosa na traqueia (Chiu et al., 2011, Macchiarini et al., 2008, Nakamura et al., 2011). O modelo era constituído por uma traqueia descelularizada, como *scaffold*, sobre o qual foi disposta a cultura de células autólogas epiteliais e as células mesenquimais (Fig.17) (Chiu et al., 2011, Macchiarini et al., 2008, Nakamura et al., 2011). O processo de diferenciação ocorreu num bioreactor durante 96 horas (Chiu et al., 2011, Macchiarini et al., 2008). Os resultados clínicos evidenciam a viabilidade do processo como opção terapêutica, na medida em que não correu rejeição e observou-se revascularização e o surgimento da mucosa (Macchiarini et al., 2008, Nakamura et al., 2011).



Figura 17 Enxerto final de traqueia imediatamente antes da implantação cirúrgica (adaptado de (Macchiarini et al., 2008))

VII. Conclusão

A engenharia de tecidos constitui uma abordagem promissora que permite regenerar, reparar ou substituir tecidos e órgãos irreversivelmente lesados, quer na sua estrutura, quer na sua funcionalidade. A investigação nesta área tem suscitado grande interesse na comunidade científica pela possibilidade de desenvolvimento de terapêuticas inovadoras e adequadas ao utente.

A metodologia em engenharia de tecidos inclui o desenvolvimento de *scaffolds*, a partir de biomateriais, que combinados com linhas celulares, formam um tecido funcional. A integração dos princípios dos novos sistemas terapêuticos permite a formação de sistemas multifuncionais de direccionamento de moléculas bioactivas, factores de crescimento e de sinalização, favoráveis ao processo de regeneração.

Os progressos alcançados na biologia celular, na ciência dos materiais e em engenharia têm propiciado e estimulado os avanços na engenharia de tecidos. A formação de equipas multidisciplinares possibilita a partilha de novos conhecimentos e a busca de soluções técnicas apropriadas que possam contribuir para o sucesso do produto em desenvolvimento.

Apesar do número de aplicações clínicas bem-sucedidas ser limitado, alguns estudos actuais mostram resultados clínicos com inequívocos benefícios para os pacientes, quando os produtos desenvolvidos são uma opção terapêutica. Actualmente, do conjunto de produtos disponíveis como opções terapêuticas na prática clínica, destacam-se os destinados à regeneração da pele, vasos sanguíneos e traqueia.

É necessário que a investigação prossiga para ultrapassar as actuais limitações e os novos desafios que vão surgindo. Os fortes investimentos na ciência devem ser estimulados, devendo ser enaltecida a importância dos avanços actuais em benefício da medicina do futuro. Para além disso, é urgente o desenvolvimento de estratégias que promovam a colaboração entre a investigação científica, o mercado empresarial e a prática clínica, de forma a agilizar o desenvolvimento do produto.

Sendo uma área ainda em grande expansão, a engenharia de tecidos possui outras aplicações igualmente promissoras, nomeadamente na compreensão do mecanismo de

inúmeras patologias, que possibilita o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos ou na realização de ensaios clínicos de medicamentos.

VIII. Bibliografia

- Akhyari, P. et al. (2011). Tissue Engineering von Herzklappen. *Der Chirurg*, 82, pp.311-318.
- Alluin, O. et al. (2009). Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. *Biomaterials*, 30, pp.363-373.
- Armentano, I. et al. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95, pp.2126-2146.
- Battiston, B. et al. (2009). Chapter 11 Tissue Engineering of Peripheral Nerves. In: Stefano, G., Pierluigi, T. & Bruno, B. (Ed.) *International Review of Neurobiology*. Academic Press.
- Battler, A. et al. (2006). Renovation of the Injured Heart with Myocardial Tissue Engineering. *Stem Cell and Gene-Based Therapy*. Springer London.
- Bauer, S., et al. (2011). Knee joint preservation with combined neutralising High Tibial Osteotomy (HTO) and Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI) in younger patients with medial knee osteoarthritis: A case series with prospective clinical and MRI follow-up over 5years. *The Knee*.
- Berthiaume, et al. (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, pp.403-430.
- Biondi, M. et al. (2008). Controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp.229-242.
- Böttcher - Haberzeth, S., Biedermann, T. & Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*, 36, pp.450-460.
- Bouten, C. V. C., et al. (2011). Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, In Press, Corrected Proof.
- Brown, J. W., et al. (2010). Performance of the CryoValve SG human decellularized pulmonary valve in 342 patients relative to the conventional CryoValve at a mean follow-up of four years. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 139, pp.339-348.
- Brown, J. W., et al. (2011). Performance of SynerGraft Decellularized Pulmonary Homograft in Patients Undergoing a Ross Procedure. *Ann Thorac Surg*, 91, pp.416-423.
- Butcher, J. T., Mahler, G. J. e Hockaday, L. A. (2011). Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp.242-268.

- Cai, X.-J. e Xu, Y.-Y. (2011). Nanomaterials in controlled drug release. *Cytotechnology*, pp.1-5.
- Cascio, B. M. e Sharma, B. (2008). The Future of Cartilage Repair. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 16, pp.221-224.
- Cebotari, S., et al. (2006). Clinical Application of Tissue Engineered Human Heart Valves Using Autologous Progenitor Cells. *Circulation*, 114, pp.1-132-137.
- Cebotari, S., et al. (2010). Tissue Engineering von Herzklappen und Myokard. *Herz*, 35, pp.334-341.
- Chan, B. e Leong, K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17, pp.467-479.
- Chen, F. M., Zhang, M. e Wu, Z. F. (2010). Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*, 31, pp.6279-308.
- Chen, Q.-Z., et al. (2008). Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59, pp.1-37.
- Chiu, L. L. Y., Chu, Z. e Radisic, M. (2011). Tissue Engineering. In: David, L. A., Gregory, D. S. & Gary, P. W. (eds.) *Comprehensive Nanoscience and Technology*. Amsterdam: Academic Press.
- Chlupac, J., Filova, E. e Bacakova, L. (2009). Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res*, 58 Suppl 2, pp.119-39.
- Christaman, K. L. e Lee, R. J. (2006). Biomaterials for the Treatment of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 48, pp.907-913.
- Chung, C. e Burdick, J. A. (2008). Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp.243-262.
- Corona, B. T., et al. (2010). Regenerative medicine: basic concepts, current status, and future applications. *J Investig Med*, 58, pp.849-58.
- Crawford, D. C., et al. (2009). An Autologous Cartilage Tissue Implant NeoCart for Treatment of Grade III Chondral Injury to the Distal Femur Prospective Clinical Safety Trial at 2 Years. *American Journal of Sports Medicine*, 37, pp.1334-1343.
- Cunha, C., Panseri, S. e Antonini, S. (2011). Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7, pp.50-59.

Dahl, S. L. M., et al. (2011). Readily Available Tissue-Engineered Vascular Grafts. *Science Translational Medicine*, 3, pp.68-69.

Dalton, P., et al. (2008). Tissue engineering of the nervous system. In: ClemensVan, B., eta al, S. (eds.) *Tissue Engineering*. Burlington: Academic Press.

De Angelis, B., et al. (2009). ReCell: A new in device for skin autologous implants in the treatment of burns and scars. *Burns*, 35, pp.S36-S36.

De Bie, C. (2007). Genzyme: 15 years of cell and gene therapy research. *Regenerative Medicine*, 2, pp.95-97.

Delcroix, G. J. R., et al. (2010). Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*, 31, pp.2105-2120.

Dieckmann, C., et al. (2010). Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental Dermatology*, 19, pp.697-706.

Domayer, S. E., et al. (2007). 238 Matrix associated autologous chondrocyte implantation with Hyalograft C in the knee: results at five years. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, pp.C135-C136.

Erggelet, C., et al. (2010). Autologous chondrocyte implantation versus ACI using 3D-bioresorbable graft for the treatment of large full-thickness cartilage lesions of the knee. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 130, pp.957-964.

Eschenhagen, T., Reichenspurner, H. & Zimmermann, W.-H. (2007). Tissue-engineered cardiovascular products. In: Robert, L., Robert, L. & Joseph, V. (eds.) *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*. Burlington: Academic Press.

Falanga, V. e Faria, K. 2007. Bioengineered skin constructs. In: Robert, L., Robert, L. & Joseph, V. (eds.) *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*. Burlington: Academic Press.

Farole, A. e Jamal, B. T. (2008). A Bioabsorbable Collagen Nerve Cuff (NeuraGen) for Repair of Lingual and Inferior Alveolar Nerve Injuries: A Case Series. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66, pp.2058-2062.

Glotzbach, J. P., et al. (2011). Regenerative Medicine. *Current Problems in Surgery*, 48, pp.148-212.

Gottlieb, D., et al. (2010). In vivo monitoring of function of autologous engineered pulmonary valve. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 139, pp.723-731.

Groeber, F., et al. (2011). Skin tissue engineering -- In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp.352-366.

Gu, X., et al. (2011). Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Progress in Neurobiology*, 93, pp.204-230.

Haifer, H., Lei, Y. e Asharaf, M. (2008). MyoCell, a cell-based, autologous skeletal myoblast therapy for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Opin Mol Ther*, 10, pp.611-21.

Haleem, A. M. e Chu, C. R. 2010. Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20, pp.76-89.

Harris, J. D., et al. (2011). Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation – a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19, pp.779-791.

Hecker, L. e Birla, R. K. (2007). Engineering the heart piece by piece: state of the art in cardiac tissue engineering. *Regenerative Medicine*, 2, pp.125-144.

Hernandez, R. M., et al. (2010). Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, pp.711-730.

Hildner, F., et al. (2011). State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, pp.e36-e51.

Hodgetts, S. I., Plant, G. W. e Harvey, A. R. (2009). Spinal Cord Injury: experimental animal models and relation to human therapy. In: Charles, W., George, P. & Gulgun, K. (eds.) *The Spinal Cord*. San Diego: Academic Press.

Huang, S. e Fu, X. (2010). Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release*, 142, pp.149-159.

Iwasa, J., et al. (2009). Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 17, pp.561-577.

Iyer, R. K., et al. (2011). Engineered cardiac tissues. *Current Opinion in Biotechnology*, In Press, Corrected Proof.

Jawad, H., et al. (2007). Myocardial tissue engineering: a review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, pp.327-342.

Jawad, H., et al. (2008). Myocardial tissue engineering. *British Medical Bulletin*, 87, pp.31-47.

Johnson, E. O., Zoubos, A. B. e Soucacos, P. N. 2005. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*, 36, pp.S24-S29.

Kakisis, J. D., et al. (2005). Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 41, pp.349-354.

Khan, O. F. e Sefton, M. V. (2011). Endothelialized biomaterials for tissue engineering applications in vivo. *Trends in Biotechnology*, 29, pp.379-387.

King, V. R. et al. (2010). The use of injectable forms of fibrin and fibronectin to support axonal ingrowth after spinal cord injury. *Biomaterials*, 31, pp.4447-4456.

Kodali, P. e Parker, R. D. (2010). Articular Cartilage Restoration: The Shape of Things to Come. *Seminars in Arthroplasty*, 21, pp.72-76.

Konig, G., et al. (2009). Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, 30, pp.1542-1550.

Kreuz, P. C., et al. (2011). Repair of Focal Cartilage Defects With Scaffold-Assisted Autologous Chondrocyte Grafts: Clinical and Biomechanical Results 48 Months After Transplantation. *The American Journal of Sports Medicine*.

L'Heureux, N., et al. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med*, 12, pp.361-365.

L'Heureux, N., Mcallister, T. N. e DE LA Fuente, L. M. (2007). Tissue-Engineered Blood Vessel for Adult Arterial Revascularization. *New England Journal of Medicine*, 357, pp.1451-1453.

Ma, P. X. 2008. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp.184-198.

Macchiarini, P., et al. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*, 372, pp.2023-2030.

Macneil, S. 2007. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445, pp.874-880.

Macneil, S. 2008. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, 11, pp.26-35.

Madigan, N. N., et al. (2009). Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 169, pp.183-199.

Mauck, R. L. e Burdick, J. A. 2011. Engineering Cartilage Tissue. *In: Pallua, N. & Suscheck, C. V. (eds.) Tissue Engineering*. Springer Berlin Heidelberg.

Melrose, J., Chuang, C. e Whitelock, J. 2008. Tissue engineering of cartilages using biomatrices. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83, pp.444-463.

Miyagawa, S., et al. (2011). Tissue-Engineered Cardiac Constructs for Cardiac Repair. *Ann Thorac Surg*, 91, pp.320-329.

Mol, A., et al. (2009). Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges. *Expert Review of Medical Devices*, 6, pp.259-275.

Müller- Goymann, C. C. (2004). Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, pp.343-356.

Myckatyn, T. M., Mackinnon, S. E. e McDonald, J. W. (2004). Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury. *Transplant Immunology*, 12, pp.343-358.

Naito, Y., et al. (2011). Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp.312-323.

Nakamura, T., Ohmori, K. e Kanemaru, S.-I. (2011). Tissue-engineered airway and “in situ tissue engineering”. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 59, pp.91-97.

Nöth, U., et al. (2010). Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, pp.765-783.

Novikova, L. N., et al. (2008). Biodegradable poly-[beta]-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials*, 29, pp.1198-1206.

Obermair, F.-J., Schröter, A. e Thallmair, M. (2008). Endogenous Neural Progenitor Cells as Therapeutic Target After Spinal Cord Injury. *Physiology*, 23, pp. 296-304.

Orlando, G., et al. (2010). Regenerative Medicine Applied to Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? *Transplantation Proceedings*, 42, pp.1011-1013.

Ossendorf, C., et al. (2007). Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res Ther*, 9, p.R41.

Peck, M., et al. (2011). Tissue engineering by self-assembly. *Materials Today*, 14, pp.218-224.

Pettikiriarachchi, J. T. S., et al. (2010). Biomaterials for Brain Tissue Engineering. *Australian Journal of Chemistry*, 63, pp.1143-1154.

Puppi, D., et al. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35, pp.403-440.

Raimondo, S., et al. (2011). Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. *Ann Anat*.

Sacks, M. S., Schoen, F. J. e Mayer, J. E. (2009). Bioengineering Challenges for Heart Valve Tissue Engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, pp. 289-313.

Schoen, F. J. (2011). Heart valve tissue engineering: quo vadis? *Current Opinion in Biotechnology*, In Press, Corrected Proof.

Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E. (2009). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of The Royal Society Interface*, 7, pp.229-258.

Shi, J., et al. (2010). Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Letters*, 10, pp.3223-3230.

Siemionow, M., Bozkurt, M. e Zor, F. (2010). Regeneration and repair of peripheral nerves with different biomaterials: Review. *Microsurgery*, 30, pp.574-588.

Silva, N. A., et al. (2010). Development and Characterization of a Novel Hybrid Tissue Engineering-Based Scaffold for Spinal Cord Injury Repair. *Tissue Engineering Part A*, 16, pp.45-54.

Simon, P., et al. (2003). Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFTTM in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, 23, pp.1002-1006.

Smith, L. A. e Ma, P. X. (2004). Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39, pp.125-131.

Straley, K. S., Foo, C. W. e Heilshorn, S. C. (2010). Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *J Neurotrauma*, 27, pp.1-19.

Stubbs, S. L., et al. (2011). Toward Clinical Application of Stem Cells for Cardiac Regeneration. *Heart, Lung and Circulation*, 20, pp.173-179.

Subramanian, A., Krishan, U. & Sethuraman, S. (2009). Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science*, 16, p.108.

Swartz, D. D., Russell, J. A. e Andreadis, S. T. (2005). Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288, pp.H1451-H1460.

Tessmar, J. K. e Gopferich, A. M. (2007). Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, pp.274-91.

Tian, W. M., et al. (2005). Hyaluronic acid hydrogel as Nogo-66 receptor antibody delivery system for the repairing of injured rat brain: in vitro. *Journal of Controlled Release*, 102, pp.13-22.

Tognana, E., et al. (2007). Hyalograft® C: Hyaluronan-Based Scaffolds in Tissue-Engineered Cartilage. *Cells Tissues Organs*, 186, pp.97-103.

Van Vlierberhe, S., Dubruel, P. e Schacht, E. (2011). Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 12, pp.1387-1408.

Vesely, I. (2005). Heart Valve Tissue Engineering. *Circ Res*, 97, pp.743-755.

Vinatier, C., et al. (2009a). Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*, 4, pp.318-29.

Vinatier, C., et al. (2009b). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology*, 27, pp.307-314.

Walpoth, B. H. (2010). Vascular organogenesis: dream or reality? *Organogenesis*, 6, pp.158-60.

Wang, H., et al. (2010). Injectable cardiac tissue engineering for the treatment of myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, pp.1044-1055.

Weber, B., Zeisberger, S. M. & Hoerstrup, S. P. (2011). Prenatally harvested cells for cardiovascular tissue engineering: Fabrication of autologous implants prior to birth. *Placenta*, 32, Supplement 4, pp.S316-S319.

Weidenbecher, M., et al. (2007). Hyaluronan-Based Scaffolds to Tissue-Engineer Cartilage Implants for Laryngotracheal Reconstruction. *The Laryngoscope*, 117, pp.1745-1749.

Willeerth, S. M. e Sakiyama-Elbert, S. E. (2007). Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp.325-338.

Willeerth, S. M. e Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). Cell therapy for spinal cord regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp.263-276.

Williams, G. M., et al. (2010). Shape, loading, and motion in the bioengineering design, fabrication, and testing of personalized synovial joints. *Journal of Biomechanics*, 43, pp.156-165.

Wood, F. (2011). Tissue Engineering of Skin. *Principles of Regenerative Medicine (Second edition)*. San Diego: Academic Press.

Wu, W., et al. (2009). Platelet-rich plasma - A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair. *Medical Hypotheses*, 72, pp.455-457.

Yasuhiko, T. (2005). Significance of release technology in tissue engineering. *Drug Discovery Today*, 10, pp.1639-1646.

Zhang, L. e Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 4, pp.66-80.

Zhang, W. J., et al. (2007). Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med*, 11, pp.945-57.

Zhong, S. P., Zhang, Y. Z. & Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, pp.510-525.