

Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras.

**Bárbara Flores Ferreira Silva Rodrigues**

# **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**



*Universidade Fernando Pessoa*

*Faculdade Ciências da Saúde*

*Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas*

*Porto, 2012*

*Autor:*

*Bárbara Flores Ferreira Silva Rodrigues*

**Engenharia de tecidos para regeneração da pele :  
retrospectiva e perspectivas futuras**

---

*(assinatura)*

*Monografia apresentada à Universidade Fernando  
Pessoa como parte de requisitos para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas*

## **Resumo**

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de tentar compreender a evolução da biotecnologia, mais concretamente da área da engenharia de tecidos, contextualizada com a evolução, em simultâneo, da área tecnológico-científica dos últimos anos e, em particular, da engenharia de tecidos aplicada à pele.

Recentemente, tem-se vindo cada vez mais a assistir a uma grande evolução na área de tratamento de inúmeras doenças através de novos métodos não convencionais. A engenharia de tecidos e a descoberta das células tronco foram as ferramentas chave que possibilitaram tal evolução.

Como a pele é o maior órgão do corpo humano e está em constante contacto com o meio externo, a sua suscetibilidade a lesões incapacitantes e limitantes da qualidade de vida do Homem é muito elevada. Como forma de fazer face a tais lesões, a biotecnologia tem vindo a desenvolver substitutos biológicos, com recurso a tecnologia de ponta, cada vez mais semelhantes à pele humana, através da engenharia de tecidos.

## **Abstract**

This work was developed with the aim of trying to understand the evolution of biotechnology, more specifically of the tissue engineering area, which was contextualised with the simultaneous evolution of the technological-scientific area from the last years and, in particular, of the tissue engineering applied to skin.

Recently, it has been possible to look at a large evolution in the treatment area of several diseases through non-conventional new methods. Tissue engineering and the discovery of stem cells have been the key tools that made that evolution possible.

Since the skin is the largest human body organ and it is in constant contact with the external environment, it has a very high susceptibility to injuries which are disabling and limiting of Man's quality of life. As a way of coping with such injuries, biotechnology has been developing biological substitutes, by using the latest technology, which are increasingly similar to human skin, through tissue engineering.

## Índice

Capítulo I – Introdução	12
1.1. A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa	12
1.2. O surgir de um novo conceito	14
1.3. Engenharia de tecidos – limitações	15
1.4. Engenharia de tecidos – perspectivas futuras	16
Capítulo II – Células tronco	18
2.1. Caracterização das células tronco	18
2.2. Células tronco embrionárias	19
2.3. Células tronco não embrionárias	20
2.3.1 Células tronco não embrionárias - tecido adiposo	20
2.3.2. Células tronco não embrionárias – pele	20
2.3.3. Células tronco não embrionárias - cordão umbilical	21
2.4. Células tronco - “nicho”	22

Capítulo III – Caracterização do suporte	23
3.1. A importância e a evolução tecnológica do suporte	23
3.2. Suporte – porosidade	24
3.3. Suporte – hidrofobia/hidrofilia	24
3.4. Suporte – bioativo	25
3.5. Suporte - métodos de produção e fabrico	26
3.6. Suporte - a importância da tridimensionalidade	26
3.7. Suporte – biomateriais	27
3.7.1. Suporte – biomateriais - polímeros naturais	28
3.7.2. Suporte – biomateriais - polímeros sintéticos	29
3.8. Suporte – condutividade dos biomateriais	31
3.9. Suporte - polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis	32
3.10. Suportes – microestruturação e nanoestruturação	33

Capítulo IV – A pele humana	35
4.1. Anatomia e funções da pele humana	35
4.2. Epiderme	37
4.3. Derme	38
4.4. Hipoderme	39
4.5. Anexos cutâneos	40
4.5.1. Pelo	40
4.5.2. Glândulas sebáceas	40
4.5.3. Glândulas sudoríparas	40
Capítulo V – A matriz extracelular	42
5.1. O papel da matriz extracelular e a importância da sua inclusão nos substitutos biológicos	42
Capítulo VI – Cicatrização da pele	44
6.1. O processo de cicatrização da pele	44

Capítulo VII – A engenharia de tecidos aplicada à pele	48
7.1. A evolução da engenharia de tecidos aplicada à pele	48
7.2. Auto, Xeno e Aloenxertos	50
7.3. Aplicações <i>in vivo</i>	51
7.3.1. Aplicações <i>in vivo</i> - substitutos epidérmicos	51
7.3.2. Aplicações <i>in vivo</i> - substitutos dérmicos	54
7.3.3. Aplicações <i>in vivo</i> - substitutos epidérmicos-dérmicos	56
7.4. Substitutos permanentes versus temporários	58
7.5. Aplicações <i>in vitro</i>	59
7.5.1. Aplicações <i>in vitro</i> - Indústria Farmacêutica e Cosmética	60
7.5.2. Aplicações <i>in vitro</i> - cicatrização de feridas	61
7.5.3. Aplicações <i>in vitro</i> - doenças e infeções	61
7.5.4. Aplicações <i>in vitro</i> - uma alternativa a testes em animais	61
Capítulo VIII – Conclusão	63
Capítulo IX – Referências bibliográficas	66

## **Índice de figuras**

Figura 1 – Representação esquemática da pele humana	36
Figura 2 - Representação esquemática do processo normal de cicatrização da pele	47

## Capítulo I – Introdução

### 1.1. A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa

As últimas décadas foram marcadas por uma significativa melhoria das condições de vida nas múltiplas dimensões que influenciam o desenvolvimento humano. A saúde passou a fazer parte das prioridades essenciais. As expectativas dos cidadãos foram sendo influenciadas por uma atmosfera de inovação, quer no domínio da prática diagnóstica quer nas atitudes terapêuticas. A medicina passou da racionalidade científica, ligada ao conhecimento científico e à evidência clínica, para uma nova fase dominada pela tecnologia.

Para tal cenário construído têm contribuído os impressionantes avanços, nomeadamente, no domínio da genética e da biotecnologia, com a emergência de áreas de elevada sofisticação tecnológica, onde se destaca a engenharia de tecidos.

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa, sendo campos emergentes na sociedade actual, têm contribuído positivamente, para o avanço do tratamento de múltiplas patologias. No entanto, permanece ainda alguma confusão acerca desta correlação entre a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa. Pode-se contudo definir a engenharia de tecidos, como o uso de materiais biodegradáveis sintéticos ou naturais, que foram semeados com células vivas, para regenerar a forma ou a função de um tecido ou órgão danificado, num paciente humano. Neste contexto, a engenharia de tecidos pode ser identificada como o conjunto de ferramentas, que pode ser usado para executar medicina regenerativa, isto, porque, nem toda a medicina regenerativa usa a engenharia de tecidos como ferramenta de recurso (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Lanza, R. *et al.*, 2007).

Trata-se de um novo cenário, que tem vindo a exigir mais atenção por parte da comunidade científica das ciências da saúde, fruto de solicitações inovadoras, resultantes de uma vivência em sociedade cada vez mais global, onde os desafios colocados ao conhecimento, são cada vez mais exigentes à escala mundial, no sentido da inovação e da eficácia. Como autora pessoal deste trabalho, as motivações que originaram a opção por este tema, prendem-se para além de um interesse particular, o facto aliado da área de biotecnologia

ser um campo muito atual e multidisciplinar, onde a inovação científica tem sofrido avanços significativos.

Fruto do exposto atrás e do facto de a medicina regenerativa ter vindo a ser gradualmente mais solicitada em alternativa aos tratamentos mais convencionais, para fazer face a doenças e/ou lesões mais debilitantes no ser humano, a engenharia de tecidos, surge como uma ferramenta, cada vez mais eficaz, para a prática da medicina regenerativa, pelas inúmeras vantagens que apresenta.

Assim, pode se afirmar, que o propósito da engenharia de tecidos é muito claro e passa pelo estabelecimento de uma nova tecnologia clínica, que torne possível o tratamento de doenças para as quais ainda não existe cura ou, onde os tratamentos disponíveis, ainda são ineficazes ou ineficientes.

A pele, como o maior órgão do corpo humano que é, desempenha funções cruciais na manutenção do bem estar do Homem.

Assim sendo, a engenharia de tecidos tem se debruçado sobre o desenvolvimento de substitutos apropriados para a pele humana, capazes de simular cada vez mais histológica, fisiológica e morfológicamente a pele humana.

A aplicação destes substitutos cutâneos já se tornou numa realidade, mas devido à complexidade em que todo o processo de produção está envolvido e aos elevados custos a ela associada, existe ainda um longo caminho a ser percorrido pela biotecnologia de forma a poder ultrapassar estes obstáculos, que têm vindo a retardar massivamente a sua aplicação e utilização.

A razão do meu interesse sobre a engenharia de tecidos insere-se num percurso de investigação, iniciado já há algum tempo, como aluna da Universidade Fernando Pessoa no curso de Ciências Farmacêuticas e muito em particular, ligado a este tema, que acho efectivamente muito interessante.

O resultado desta investigação permitiu aferir a evolução tecnológica desta

engenharia, desde os seus primórdios, até aos mais recentes avanços e aplicações *in vivo* e *in vitro*. Para além do aspeto referido, facultou também, conhecer os substitutos já desenvolvidos e comercializados para o efeito e, ainda, compreender todo o processo complexo, que envolve a sua produção.

## 1.2. O surgir de um novo conceito

As doenças, as malformações congénitas e os ferimentos fizeram sempre parte da vida do Homem. O recurso a materiais e próteses que permitem substituir membros ou tecidos, resultaram sempre numa resolução parcial do problema principal (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Já no século XVI Tagliacozzi de Bolonha, Itália, descreveu no seu livro, o trabalho que desenvolveu, acerca da reconstrução do nariz a partir do antebraço. Mais tarde, com a evolução científica, que decorreu do século XX, surgiram conceitos novos, como, por exemplo, a esterilização, que possibilitaram o aparecimento da cirurgia moderna (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Já na era moderna, foram surgindo várias técnicas de transplantação de tecidos e de órgãos, bastante revolucionárias, uma vez que a transplantação podia dar-se directamente de um individuo para outro, o que possibilitou uma diminuição da morbilidade e mortalidade na população. Apesar de todo este sucesso, imediatamente surgiram limitações ligadas a este método, devido à ocorrência de rejeições crónicas por parte do sistema imunitário do recetor, que muitas vezes não eram facilmente resolvidas, mesmo recorrendo ao uso de imunossuppressores. Também o facto de não existirem órgãos suficientes para toda a população, colocou logo à transplantação de órgãos, mais um problema e, é neste contexto, que surge a apelidada engenharia de tecidos (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Um marco importante emergido foi que já desde os anos setenta, novas descobertas em diversas áreas tais como: biologia celular, biologia molecular, biologia das células tronco, bioquímica, engenharia genética e os avanços tecnológicos verificados, tinham dado particular ênfase ao conceito de engenharia de tecidos. Mas foi a partir de meados dos anos oitenta, que a engenharia de tecidos passou de um simples conceito, para uma área científica

com grande importância (Lanza, R. *et al.*, 2007; Bajada, S. *et al.*, 2008; Ikada, Y. *et al.*, 2006).

Um artigo publicado na revista Science, em 1993, escrito por Langer e Vacanti, diz que a engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar, que aplica os princípios da engenharia e as ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos, a fim de poder melhorar, mater ou restaurar a função de um tecido (Bajada, S. *et al.*, 2008).

De uma forma generalizada, pode-se afirmar que são três os pontos chave necessários a considerar durante o desenvolvimento dos substitutos: evitar uma resposta imunitária, usar o substrato mais adequado para a diferenciação e sobrevivência celulares e, providenciar um ambiente apropriado com todas as condições necessárias à manutenção do tecido (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Imitar a natureza humana implicará então recorrer, antes de mais, a uma base ampla de conhecimentos de biologia, com enfoque em especial nos tecidos e nos órgãos e, assim, nesta base, poder controlar todos os eventuais processos biológicos, que possam surgir e desenvolver novas estratégias para a produção de tecidos vivos. É neste desafio de imitar a natureza e que foi aceite por aqueles, que estão a liderar esta nova área da tecnologia, chamada engenharia de tecidos, que permitiu contribuir para o surgimento de um novo paradigma. Este novo cenário poderá potenciar um ciclo novo, uma vez que a longo prazo, a engenharia de tecidos, capacitará reunir outro potencial para a criação de vários órgãos vitais e assim, desta forma, facultará a substituição da técnica tradicional de transplantação de órgãos (Lanza, R. *et al.*, 2007; Ikada, Y. *et al.*, 2006 ).

### 1.3. Engenharia de tecidos – limitações

Apesar do promissor sucesso já verificado, a engenharia de tecidos enfrenta ainda, um longo caminho a percorrer, a fim de que possa ser, definitivamente, implementada e veja a possibilidade para a resolução dos vários problemas, que lhe são associados. As dificuldades que lhe têm sido levantadas englobam essencialmente questões éticas e jurídicas associadas à utilização de células tronco embrionárias e a possíveis obstáculos de natureza diversa, tais

como: rejeições por parte do recetor, infeções, desconhecimento das implicações a longo prazo, incapacidade do tecido produzido reproduzir a 100% o tecido em causa em toda a sua complexidade e ainda, o não acompanhamento do crescimento do tecido transplantado com o crescimento do paciente (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Lanza, R. *et al.*, 2007 ; Bajada, S. *et al.*, 2008).

É pacífica a opinião de que embora seja mais provável encontrar soluções capazes de resolver os problemas, já a longo prazo, permanece um grande debate acerca de todos os prós e contras inerentes a esta área da biotecnologia, que a tem colocado num longo compasso de espera, que tem sido difícil de ultrapassar (Metcalf, D. *et al.*, 2007; Lanza R. *et al.*, 2007; Ikada, Y. *et al.*, 2006).

#### 1.4. Engenharia de tecidos – perspectivas futuras

Apesar das limitações atuais apresentadas pela engenharia de tecidos, esta área, a longo prazo, apresenta um grande potencial de mercado, uma vez que potenciará aumentar o leque de tratamentos disponíveis e mesmo, também, até poderá melhorar os resultados entretanto já alcançados, através dos métodos convencionais utilizados no tratamento de certas doenças (Lanza R. *et al.*, 2007).

A engenharia de tecidos, a longo prazo, sofrerá, certamente, um aperfeiçoamento nos resultados até agora obtidos e, concomitantemente, verificará um alargamento da sua aplicabilidade. Este cenário será seguramente conseguido, pois haverá ainda, com certeza, no futuro, uma maior compreensão sobre a biologia celular, um melhoramento dos sistemas de cultura celulares e das estruturas de suporte pela utilização de biomateriais de vanguarda, que permitirá assim, a obtenção de substitutos cada vez mais próximos da realidade e desta forma alargará o leque de possibilidades de tratamento em doenças genéticas, do sistema urinário, circulatório, respiratório, nervoso, doenças hepáticas, ósseas, cutâneas, entre outras (Lanza R. *et al.*, 2007).

A sociedade atual herdou e criou gradualmente novos problemas de natureza ética, que não podem deixar qualquer ser humano indiferente, como é o caso do domínio onde as

células tronco embrionárias se movimentam.

Perante a grandeza dos problemas originados pela utilização incorrecta de determinadas descobertas científicas, parece ser da máxima importância, questionar até que ponto a engenharia de tecidos poderá sofrer de impedimentos inultrapassáveis, por parte da ética, que possam de certo modo impedir o avanço da investigação científica.

Como forma de ultrapassar cenários impeditivos impostos em nome de uma ética mais exigente, espera-se que o bom senso possa sempre manifestar-se na comunidade científica, onde o bem-estar humano, em termos de saúde, possa imperar.

## Capítulo II – Células tronco

### 2.1. Caracterização das células tronco

As células tronco, células mãe ou células estaminais foram as células impulsionadoras da engenharia de tecidos. Estas células foram, pela primeira vez, estudadas em 1963, por Becker, que após a realização de variados estudos com células da medula óssea de ratos, chegou à conclusão, que essas células possuíam propriedades únicas de autorrenovação infinitas (Sharples, F. E. et al., 2003; Bajada, S. et al., 2008).

Estas células possuem duas propriedades, que as possibilitam distinguir de todas as restantes, colocando-as assim num patamar superior, podendo ser identificadas por: capacidade infinita de autorrenovação, o que origina mais células tronco e capacidade de se poderem diferenciar em diferentes linhagens celulares, quando são mantidas nas condições apropriadas (Paspala, S. et al., 2011).

Mas apesar de bastante promissoras, as células tronco até à data, apenas concretizaram poucos exemplos de aplicação clínica. Este facto poderá ser explicado pelos seguintes factos relatados (Bajada S. et al., 2008):

- Apoptose celular pós-implantação;
- Dificuldades na obtenção de vascularização;
- Problemas relacionados com o tipo de biomaterias utilizados;
- Questões de foro ético;
- Custos associados às culturas celulares prolongadas.

As células tronco são classificadas em dois grandes grupos: o que engloba as células tronco embrionárias e o das células tronco não embrionárias. As células tronco embrionárias têm um grande potencial de uso na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa, mas o seu uso tem sido ainda muito limitado, devido ao facto de levantar muitas questões éticas. Por enquanto a opção mais viável e menos controversa, tem sido a do uso de células tronco não-embrionárias (Sharples, F. E. et al., 2003; Bajada S. et al., 2008).

Até ao presente, os resultados conseguidos experimentalmente e clinicamente têm sido bastante promissores e é possível, que num futuro próximo, a terapia para múltiplas patologias, passe a ser realizada através de células tronco (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada S. *et al.*, 2008).

## 2.2. Células tronco embrionárias

As células tronco embrionárias são originárias a partir de um blastocisto com cerca de oito dias de vida. Estas células tronco embrionárias são caracterizadas por apresentarem pluripotência ou totipotência, isto é, têm a capacidade de se diferenciarem ilimitadamente e originarem os vários e diferentes tipos de células existentes (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

A diferenciação controlada destas células, em células mais específicas, dar-se-á em culturas com factores de crescimento em condições apropriadas. Estas células têm ainda a capacidade de criar linhagens celulares, que são caracterizadas por uma imortalidade celular em cultura acoplada à manutenção do vigor celular, por um longo período de tempo. (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada S. *et al.*, 2008).

Mas o uso destas linhagens celulares tem apresentado algumas limitações, apesar do seu grande potencial para a engenharia de tecidos, nomeadamente, alguns problemas *in vitro*, mais propriamente, a ocorrência de uma divisão celular descontrolada desencadeando o aparecimento de células tumorais (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada S. *et al.*, 2008).

As células tronco embrionárias têm ainda um longo caminho a percorrer, até conseguirem adquirir um estatuto na engenharia de tecidos, uma vez que o seu uso tem gerado bastante controvérsia, relativamente a questões éticas. Vários cientistas têm sido mesmo acusados de usar células tronco embrionárias, com o objetivo de interferir em todo o processo natural da vida (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

Mas apesar de tanta controvérsia, é um facto que estas células tronco apresentam bastante efetividade, quando comparadas com as células tronco não embrionárias, pela

pluripotência que apresentam (Paspala, S. *et al.*, 2011).

### 2.3. Células tronco não embrionárias

São também designadas por células tronco adultas. Não desempenham um papel tão importante como as anteriormente descritas, uma vez que apresentam apenas multipotência, que se caracteriza pela capacidade de dar origem a outros tipos de células, mas em número muito mais limitado. Assim, a diferenciação celular *in vitro* estará muito mais limitada (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

Mas este grupo de células tronco não embrionárias acaba por beneficiar da controvérsia gerada em torno das células tronco embrionárias, pois não suscita tantos problemas éticos e podem ser encontradas nos mais variados locais do organismo, entre os quais: o tecido adiposo, a medula óssea, a pele e o cordão umbilical (Sharples, F. E. *et al.*, 2003; Bajada, S. *et al.*, 2008).

#### 2.3.1 Células tronco não embrionárias - tecido adiposo

O tecido adiposo humano é uma alternativa possível para a obtenção de células tronco multipotentes visto demonstrarem grandes capacidades osteogénicas *in vivo* e *in vitro* e ainda aliando-se ao facto a estas últimas poderem ser induzidas *in vitro* para a sua diferenciação, em várias linhagens celulares, tais como: neurogénicas, adipogénicas, hepáticas, entre outras. A investigação realizada neste âmbito permitiu já evidenciar a sua viabilidade em medicina regenerativa, uma vez que se conseguem manter viáveis *in vitro* por longos períodos de tempo (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

#### 2.3.2. Células tronco não embrionárias - pele

A descoberta deste tipo de células tronco, revelou-se um marco bastante significativo no tratamento de doenças do foro neurológico uma vez que estas representam uma fonte de precursores neurais bastante acessível e disponível, para uso em terapia regenerativa do sistema nervoso (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

O seu potencial de uso passa, nomeadamente, pela sua diferenciação, em Schwann cells. Uma vez que estas Schwann cells apresentam baixa capacidade de expansão, o recurso a células tronco é uma boa opção para a sua obtenção (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

O interesse científico nestas Schwann cells é justificado pelo facto de estas serem bastante utilizadas em tratamentos de neuropatias, resultantes da sua ausência ou da sua ineficiência (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

### 2.3.3. Células tronco não embrionárias - cordão umbilical

Normalmente, o cordão umbilical é descartado após o parto. Contudo, o sangue que está dentro do cordão, bem como o próprio tecido, são ambos extremamente ricos em células tronco. Estas células são provenientes do cordão umbilical e possuem a capacidade de se diferenciar em todas as outras células do corpo humano e, pela sua importância, são actualmente criopreservadas, imediatamente, após o momento de nascimento do bebé (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

Existem dois tipos de células tronco que são criopreservadas a partir do cordão umbilical: as existentes no sangue do cordão umbilical (hematopoiéticas) e as do tecido do cordão umbilical (mesenquimais). As primeiras caracterizam-se por serem capazes de restaurar as funções do sangue, enquanto as segundas, são amplamente utilizadas na medicina regenerativa pelo potencial que possuem para o tratamento de diversas doenças. Estas últimas graças à sua capacidade de se diferenciarem nos diversos tipos de células, que constituem o nosso corpo, tais como as células do tecido conjuntivo, nervosas, cardíacas, entre outras, podem então ser utilizadas para restaurar funções de órgãos vitais do nosso corpo (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

O uso desta classe de células tronco, apresenta inúmeras vantagens do ponto de vista ético, daí que já existam bancos para esta classe de células tronco, estando já a ser usadas, em prática corrente, a nível mundial (Bajada, S. *et al.*, 2008; Paspala, S. *et al.*, 2011).

## 2.4. Células tronco - “nicho”

Várias teorias foram propostas para explicar a capacidade das células tronco poderem gerar linhagens celulares. Uma das teorias, bastante em foco, está relacionada com o microambiente das células tronco ou, também, chamado de “nicho”. Este “nicho” consiste em moléculas sinalizadoras, comunicação intercelular e na interação entre as próprias células tronco e a matriz extracelular (MEC), que as rodeia (Bajada, S. *et al.*, 2008).

Parece pois que o microambiente tridimensional circundante tem bastante influência sobre os genes e sobre as propriedades, que garantem a autorrenovação e o desenvolvimento celulares (Bajada, S. *et al.*, 2008).

Embora haja bastante investigação nesta área, ainda será necessária mais, para que no futuro, se possa conseguir compreender, totalmente, todo o mecanismo de diferenciação das células tronco (Bajada, S. *et al.*, 2008).

## Capítulo III – Caracterização do suporte

### 3.1. A importância e a evolução tecnológica do suporte

Como foi referido atrás, a engenharia de tecidos começou a assumir um estatuto particularmente relevante no contexto da sobrevivência humana, onde o campo científico e tecnológico se enriqueceram e alargaram, graças aos contributos recebidos, entre outros, da biologia celular, biologia molecular, bioquímica e genética (Willerth, S. *et al.*, 2008).

Simultaneamente a estes avanços científicos e tecnológicos verificados, a criação de substitutos biológicos, evoluiu também, requerendo para esse efeito o desenvolvimento de um suporte biodegradável, poroso, biocompatível e, ainda, possuidor de uma superfície condutora (Willerth, S. *et al.*, 2008).

Como primeiro passo para a produção de tecidos *in vitro*, a engenharia de tecidos, sentiu a necessidade de criação de um suporte apropriado, tendo em conta, o tipo de lesão, o local e a extensão da mesma (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

A criação destes suportes tem vindo, gradualmente, a apresentar, uma série de propriedades com o fim de garantir o correto e eficaz crescimento do tecido.

O suporte mecânico temporário, que foi desenvolvido, terá de ser capaz de fornecer eficácia e segurança para o tecido em regeneração e terá de ser capaz de se biodegradar em subprodutos biocompatíveis, numa escala de tempo julgada apropriada, a fim que o novo tecido possa substituir o suporte, possibilitando a adesão, fixação e a proliferação celulares (Lanza, R. *et al.*, 2007; Liu, C. *et al.*, 2007; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Em termos finais, há um vasto conjunto de aplicações, que necessariamente têm que estar sempre presentes nos produtos, que são utilizados na engenharia de tecidos. Estes requerem, obrigatoriamente, a existência de um suporte para o crescimento de um tecido novo, onde alguns aspetos assumem particular relevo, tais como: a existência de comunicação intercelular, disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e a presença de substâncias

ativas. Estes aspetos terão sempre que ser maximizados e terá que haver, obrigatoriamente, uma resposta tecidual orientada, concomitantemente, terá de haver inibição da adesão celular e/ou ativação, seguida de uma prevenção para uma resposta biológica possível originada por um bloqueio de anticorpos contra o enxerto, utilizando-se para esse efeito terapias imunossupressoras (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

A função primordial do suporte, como já foi referido, irá ser, direccionar o crescimento e a migração das células para os tecidos circundantes e para facilitar o crescimento das células inoculadas, no suporte antes da sua implantação. Vários engenheiros, actualmente, estão a trabalhar para desenvolver novos suportes, que possam ter maior especificidade, menor custo de produção e que possam controlar melhor o fator tempo (Liu, C. *et al.*, 2007, Willerth, S. *et al.*, 2008).

### 3.2. Suporte – porosidade

O diâmetro dos poros e a interconectividade dos mesmos no suporte, são essenciais para possibilitarem quer a formação do tecido e o transporte de substâncias, quer ainda, a vascularização do tecido em crescimento. Para esse efeito foi criada uma geometria de poros, que pudesse garantir uma correta troca de massas de nutrientes e de resíduos biológicos *in vivo* e *in vitro*. A porosidade ideal corresponde aos 90% da superfície do suporte e o diâmetro ideal, para o poro, deverá aproximar-se dos 100 micrómetros (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Willerth, S. *et al.*, 2008; Lanza, R. *et al.*, 2007; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

### 3.3. Suporte – hidrofobia /hidrofilia

A interação entre as células, vai ser totalmente dependente das características físico-químicas à superfície dos biomateriais. A adesão celular é ótima quando os substractos apresentam uma moderada hidrofilia. Uma vez que já foi comprovado, que se estes apresentarem elevada hidrofilia, verifica-se a ocorrência de uma ligação mais fraca e, ainda, se os substractos forem hidrofóbicos, a absorção de proteínas ocorre quando estas estão na sua forma rígida ou desnaturada, dificultando o fenómeno de adesão celular (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

### 3.4. Suporte – bioativo

A utilização de suportes, que apresentam como complemento adicional a vantagem de poderem ainda carregar alguns compostos biologicamente activos, podem estar associados a factores, tais como: de crescimento, antibióticos e citoquinas. Para além disso, estes suportes bioativos, podem ainda efetuar uma libertação controlada desses compostos, podendo ser, por essa razão, encarados num futuro próximo, como um possível sistema de distribuição de fármacos (Willerth, S. *et al.*, 2008; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Através de estudos efetuados neste campo relativo à incorporação de biomoléculas no suporte, foi possível demonstrar a importância da localização de proteínas, como as integrinas e as lamininas nos suportes, para que ocorra a ligação das células à superfície do suporte. A imobilização destas proteínas no suporte deverá não só promover a adesão e a proliferação celulares, mas também, a molhabilidade de polímeros hidrofóbicos, uma vez que estes tem maior dificuldade em estabelecer a adesão celular ao suporte (Willerth, S. *et al.*, 2008; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

A incorporação de biomoléculas nos suportes, contudo, apresenta algumas limitações, nomeadamente, a exposição dos suportes com as biomoléculas a elevadas temperaturas (acima dos 70°C) e/ou a condições químicas bastante agressivas, sob pena de poderem causar uma degradação das biomoléculas. É por isso necessário controlar estes dois factores, como forma de não expor as biomoléculas a eles, durante o processo de fabrico do suporte. Outro problema, que se coloca, é a elucidação das consequências a longo prazo do uso destas moléculas bioativas para a própria célula e para os tecidos. Apesar de tudo, considera-se a presença destas biomoléculas como uma chave para um eficaz funcionamento do suporte, pois mostraram-se adequadas na promoção de um correto crescimento e maturação celulares (Willerth, S. *et al.*, 2008).

São várias as estratégias que têm sido usadas pelos cientistas para a incorporação destas biomoléculas. Recentemente, um novo método tem sido utilizado de incorporação direta do fator de crescimento no suporte, pois é por esta forma, que a sua libertação consegue ser mais localizada e controlada (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Uma estratégia bastante promissora para a futura imobilização de proteínas e fatores de crescimento à superfície do suporte, passará, seguramente, pela funcionalização da superfície do suporte (Willerth, S. *et al.*, 2008; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

### 3.5. Suporte - métodos de produção e fabrico

Há no entanto um particular cuidado a reter, pois para além da importância de efetuar a escolha apropriada dos biomateriais, que irão ser utilizados no suporte, é particularmente importante, a escolha do método de produção a realizar (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Lanza, R. *et al.*, 2007; Liu, C. *et al.*, 2007).

Ressalva-se o aspeto de o método de fabrico poder afetar vários campos, tais como a: própria resistência mecânica, porosidade, taxa de degradação, superfície química e a capacidade de incorporação de moléculas biologicamente ativas (Lanza, R. *et al.*, 2007; Liu, C. *et al.*, 2007).

Neste particular, embora cada método de produção apresente as suas vantagens e desvantagens, a escolha da técnica de fabrico dos suportes depende, quase sempre, exclusivamente, do material que se vai usar e da própria função inicialmente proposta para o suporte em causa (Willerth, S. *et al.*, 2008; Liu, C. *et al.*, 2007).

### 3.6. Suporte - a importância da tridimensionalidade (3D)

Os órgãos e tecidos são estruturas tridimensionais em termos espaciais. As células, como unidades estruturais básicas do organismo, organizam-se a partir do nível molecular e celular até ao tecido ou ao nível do órgão. No corpo humano estas estruturas experimentam um microambiente tridimensional, que é regulado por fatores solúveis, pelas células circundantes e pelas moléculas da matriz extracelular (Lanza, R. *et al.*, 2007; Liu, C. 2007; Lebonvallet, N. *et al.*, 2010).

Alguns testes realizados *in vitro* permitiram concluir, que o comportamento celular e

as características fenotípicas das células são completamente diferentes, quando estas são cultivadas num suporte tridimensional (3D) versus bidimensional (2D). O suporte tridimensional contextualiza a célula num espaço idêntico ao que tem *in vivo* e permite ainda, manipular e otimizar as propriedades funcionais das células, pois o suporte 3D garante a manutenção das interações célula-célula e as interações célula-matriz extracelular (Liu, C. *et al.*, 2007; Lebonvallet, N. *et al.*, 2010; Grober, F. *et al.*, 2011).

Neste contexto, torna-se por isso num conceito-chave na engenharia de tecidos, o uso de materiais de suporte tridimensionais e porosos, para oferecer um apoio físico e um ambiente local para as células que facilite e permita o desenvolvimento do tecido (Lanza, R. *et al.*, 2007) .

### 3.7. Suporte - biomateriais

A seleção dos biomateriais constitui uma etapa chave para o sucesso no desenvolvimento dos implantes usados na engenharia de tecidos. É na engenharia de tecidos, que os biomateriais vão ter a função de substituir biológica e mecanicamente a matriz extracelular, que constitui a componente existente no espaço intercelular, do corpo humano. Concretamente é *in vivo*, que os biomateriais têm que ter capacidade de resistência, de forma a não colapsarem, a fim de garantirem a manutenção da estrutura tridimensional durante todo o processo de desenvolvimento do tecido e quando as actividades diárias do individuo se realizam (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Liu, C. *et al.*, 2007).

Os biomateriais devem ter viabilidade de fabrico, capacidade de transformação no produto final, propriedades mecânicas, capacidade para a ligação de compostos ativos e também para a sua libertação controlada. Estes materiais deverão ser imperativamente biocompatíveis, isto é, capacitarem a origem de produtos não tóxicos, após a sua degradação *in vivo* (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Willerth, S. *et al.*, 2008; Lanza, R. *et al.*, 2007) .

O conceito de biocompatibilidade surge assim associado à definição da capacidade de habilidade do material para poder actuar, através de uma resposta apropriada, quando colocado em contacto com o receptor numa dada aplicação específica (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

Na clássica escolha de biomateriais, a opção sempre incidiu sobre algo o mais inerte possível, enquanto actualmente, o que se procura conseguir, é que os biomateriais para além de biocompatíveis, simultaneamente, possuam a capacidade de interagir com a região circundante. Deverão pois deixar de ter uma atuação passiva, passando a atuar como análogos da matriz extracelular, regulando assim, todo o processo de adesão celular ao suporte (Willerth, S. *et al.*, 2008; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Muitas vezes são incorporados outros componentes nos biomateriais do suporte para melhorar o seu aproveitamento e assim este poder controlar melhor a interação celular. Em concreto os exemplos específicos sobre os componentes a serem incorporados são: fatores de crescimento e ainda outros fatores bioativos, a fim de poder obter a resposta celular desejada (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

Actualmente existem duas grandes classes de biomateriais, que têm sido usados na engenharia de tecidos: a classe dos polímeros de origem natural e a classe dos polímeros sintéticos ( Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

### 3.7.1. Suporte – biomateriais - polímeros naturais

A primeira classe de polímeros acima citada (polímeros naturais), pode, ainda, ser classificada em três subclasses: as proteínas (soja, colagénio, gelatina, seda, fibrinogénio, elastina, queratina, albumina), os polissacarídeos (agarose, amido, dextrano, glicaminoglicanos, alginato, ciclodextrinas, derivados do ácido hialurónico e quitina) e os polinucleótidos (DNA e RNA) (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

Em particular, a quitina tem tido variadas aplicações na engenharia de tecidos devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo e baixa imunogenicidade, que apresenta. Este polímero natural apresenta carga positiva (ou catiónica, devido a existência do grupo funcional: amina), que irá permitir à quitina o estabelecimento de ligações com uma grande variedade de substâncias com carga oposta, tais como DNA e glicosaminoglicanos (GAG) (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

Estudos efectuados recentemente, demonstraram, ainda, que a quitina apresenta mais uma vantagem na sua utilização, que é a sua capacidade de se degradar em compostos que entram na constituição do corpo humano (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

Estas três subclasses de biomateriais, devido à sua semelhança com a estrutura macromolecular dos tecidos do corpo humano, irão ter um maior reconhecimento do sistema biológico comparativamente com os polímeros sintéticos. A sua degradação é caracterizada por ocorrer pela ação das enzimas naturais existentes. Embora esta forma de degradação ocorra de uma forma mais natural, o facto de depender das enzimas naturais existentes no organismo dificulta o controlo da mesma. Felizmente isto já pode ser facilmente ultrapassado, por modificações químicas na estrutura dos polímeros, antes destes mesmos serem implantados no organismo (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

Quanto à sua estrutura, estes polímeros, são bastante mais complexos do que os polímeros sintéticos, acarretando complicações para a escolha da técnica mais apropriada para a manufatura do suporte. Apresentam ainda uma grande limitação, que reside na grande variabilidade da sua estrutura macromolecular, o que dificulta ainda, mais o seu uso, uma vez que cada um destes polímeros aparece como uma entidade quimicamente distinta de uma espécie para outra e até mesmo de um tecido para outro (Liu, C. *et al.*, 2007).

### 3.7.2. Suporte – biomateriais - polímeros sintéticos

Relativamente à classe dos polímeros sintéticos, estes representam o maior grupo dos polímeros, apresentando múltiplas vantagens relativamente aos anteriormente já referidos, pois apresentam possibilidades de reprodução e manipulação, o que permite adaptar mais as suas características, consoante a sua finalidade (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

O seu conjunto de características premeditadas e reprodutíveis permitirão ainda prever a forma como se irão comportar, quando aplicados no suporte. A manipulação das suas características é uma mais-valia para estes polímeros, permitindo assim, adequá-los a múltiplas aplicações específicas, ou seja, a vários tipos de tecidos. Destaca-se a manipulação da molhabilidade da superfície destes polímeros sintéticos, por poder ser regulada por

tratamentos físicos (Liu, C. *et al.*, 2007; Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Os polímeros sintéticos mais usados atualmente na engenharia de tecidos incluem os poli-alfa-hidroxiésteres (são poliésteres saturados e alifáticos), que contemplam os: poli (etilenoglicol) (PEG), poli (ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) (Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

As propriedades químicas dos poli-alfa-hidroxiésteres permitirão a ocorrência de uma degradação hidrolítica nos seus componentes monoméricos, fazendo com que possam ocorrer a sua remoção por processos naturais. O próprio corpo humano já possui mecanismos altamente especializados e regulados para que possa haver a remoção completa dos componentes monoméricos, nomeadamente, do PLA e do PGA, daí que sejam estes dois polímeros sintéticos, os que mais tem vindo a ser utilizados nos produtos no mercado (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Liu, C. *et al.*, 2007; Willerth, S. *et al.*, 2008).

Estes poliésteres saturados e alifáticos possuem ainda a seu favor uma grande facilidade de processamento e de ajustamento das suas taxas de degradação, das suas características físico-químicas e das suas propriedades mecânicas, conseguidas através do uso de variados copolímeros com diferentes pesos moleculares (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Liu, C. *et al.*, 2007).

A degradação destes poliésteres biodegradáveis ocorrerá após um aumento da quantidade de água que, por sua vez, dará origem à hidrólise das ligações éster. A cinética de degradação destes poliésteres, irá ser afetada por uma variedade multifatorial, cujas características são: a composição química, a massa molar, as propriedades estereoquímicas, o índice de polidispersão, cristinilidade, condições ambientais, entre outros (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Liu, C. *et al.*, 2007).

Dentro dos polímeros sintéticos, destaca-se ainda a classe de poliésteres alifáticos microbianos - os polihidroxicanoatos (PHA) - que são biodegradáveis (via hidrólise) e são produzidos por microrganismos sob condições controladas de crescimento. Como exemplo desta classe, pode-se incluir o PHB (poli - 3- hidroxibutirato) e os seus copolímeros. Dependendo da finalidade a que se destinam os polihidroxicanoatos podem ainda possuir

uma superfície modificada ou, composta por uma mistura com outros polímeros, enzimas ou, materiais inorgânicos (Willerth, S. *et al.*, 2008 ).

Contudo, o inconveniente da sua utilização, na engenharia de tecidos, passa pelo elevado tempo perdido na sua extração das culturas bacterianas de forma a obter uma quantidade suficiente de PHA. Para isso o aumento do rendimento e da eficácia do processo extrativo, assim como a redução dos custos efetivos de produção, será um desafio, futuramente, aliciente a enfrentar (Willerth, S. *et al.*, 2008).

Existem ainda outras duas subclasses de polímeros sintéticos. Uma, incluindo os que se baseiam em péptidos, que consistem em pequenas sequências de aminoácidos e que tem a capacidade de se agrupar e formar um suporte para incorporar as células-tronco e outra, que se baseia em cerâmica, de origem inorgânica. Esta última subclasse, tem vindo a ser cada vez mais utilizada, como biomaterial nos suportes para crescimento de tecido ósseo, devido à sua composição química (Willerth, S. *et al.*, 2008).

Apesar de promissores, os polímeros sintéticos têm ainda que ultrapassar alguns problemas, nomeadamente, o do elevado custo de fabrico dos suportes que, por sua vez, se associa também à necessidade de os polímeros, terem que ser quimicamente manipulados e de baixa biocompatibilidade *in vivo* e, por fim, à ocorrência da própria possível rejeição pelo desencadear de uma resposta imunitária do receptor (Willerth, S. *et al.*, 2008).

### 3.8. Suporte – condutividade dos biomateriais

A condutividade eléctrica dos materiais tem a capacidade de melhorar a performance da célula, constituindo um marco importante sempre a considerar (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Através de trabalhos experimentais realizados neste âmbito pode-se concluir, que a adesão celular é mais eficaz, quando as superfícies dos biomateriais se encontram carregadas positivamente, se comparadas com superfícies carregadas negativamente. A razão pela qual isto se verifica é a carga negativa, que as moléculas mediadoras da adesão (da matriz extracelular) apresentam, uma vez que cargas opostas atraem-se. A incorporação de grupos

funcionais à superfície dos suportes com carga positiva (por exemplo as aminas), tem sido então um mecanismo bastante utilizado como uma forma de facilitar o processo de adesão celular. A carga elétrica da superfície e a condutividade do material, têm sido igualmente importantes para a ocorrência da adesão e colonização celulares (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Neste particular, a condução elétrica surge como um mecanismo importante, que permite a sinalização celular e o funcionamento dos vários tecidos. A utilização de biomateriais com condutividade elétrica, vai então permitir a regularização da sinalização celular e até o próprio funcionamento dos tecidos. Hoje em dia, já estão disponíveis alguns polímeros com condução elétrica no mercado, que incluem compostos orgânicos, como o poli (pirrol), o poli (acetileno), a poli (anilina), entre outros (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

A base mecanista da condutividade dos biomateriais, na engenharia de tecidos, é de extrema importância para estes materiais, mas as suas interações ainda não estão totalmente compreendidas na actualidade. Esta será com certeza uma área a explorar num futuro muito próximo (Lanza, R. *et al.*, 2007).

### 3.9. Suporte - polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis

Cada vez mais tem-se dado gradualmente ênfase à conceção e escolha dos biomateriais do suporte visto que, a degradação do suporte, origina produtos, que irão ser libertados no corpo. Recentemente vários testes têm sido levados a cabo para prever todo o tipo de reações potenciais inflamatórias e de toxicidade resultantes da degradação do polímero *in vivo* (Barbanti, S. *et al.*, 2005; Liu, C. *et al.*, 2007).

Em primeiro lugar, biodegradável é um termo utilizado para polímeros, que devido à sua degradação macromolecular originam *in vivo*, produtos e subprodutos resultantes da sua degradação, não tóxicos e não nocivos para o organismo humano. Ou seja, os polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos, originando, obrigatoriamente, fragmentos ou outros subprodutos, da sua degradação, que não representam uma ameaça toxicológica para o organismo (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

Já no que respeita aos polímeros bioreabsorvíveis, são constituídos por materiais poliméricos, que se podem dissolver nos fluidos corporais, sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou, redução da massa molar. A bioreabsorção é realizada pelo nosso organismo quando ocorre a biodegradação, que origina por sua vez produtos e subprodutos com as mesmas características dos metabolitos orgânicos (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

Assim sendo, actualmente, a escolha do tipo de polímero utilizado incide sobretudo nos polímeros simultaneamente biodegradáveis e bioreabsorvíveis pois, apresentam mais vantagens para aplicação *in vivo* (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

### 3.10. Suportes – microestruturação e nanoestruturação

O uso de estruturas com microdomínios, resultantes da microestruturação, nos suportes tem vindo a mostrar que pode promover uma maior e melhor organização espacial específica das células, direccionar melhor a migração, o crescimento celular e induzir a diferenciação e a funcionalização das mesmas (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

Estes biomateriais microestruturados, quando utilizados no suporte, permitem ainda a criação de uma adesão preferencial de certos tipos de células relativamente a outros tipos e, comparativamente, com os biomateriais não microestruturados as funcionalidades celulares ficam aumentadas. A microestruturação pode ainda ajudar a estabelecer a comunicação e a cooperação entre diferentes tipos de células, o que é absolutamente necessário para a construção de todo o tipo de tecidos e órgãos. No entanto, a superfície pode ainda variar numa nanoescala (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

As superfícies nanoestruturadas foram concebidas para inúmeras aplicações biomédicas, mais concretamente com o objetivo de promover uma libertação mais controlada no espaço e no tempo de biomoléculas. O uso de superfícies nanoestruturadas, em engenharia de tecidos, poderá também promover uma libertação controlada de biomoléculas incorporadas no suporte *in loco* (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

De uma forma geral o comportamento celular em superfícies nanoestruturadas, é bastante mais orientado e organizado do que nas superfícies microestruturadas. As superfícies

nanoestruturadas serão então por isso uma promissora ferramenta, para a engenharia de tecidos (Bacakova, L. *et al.*, 2011).

## Capítulo IV – A pele humana

### 4.1. Anatomia e funções da pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo por isso responsável por desempenhar múltiplas funções, tais como garantir a homeostasia corporal, proteção contra toxinas, microrganismos patogénicos e desidratação. Apresenta também uma elevada funcionalidade metabólica, imunitária e sensorial graças à elevada inervação e vascularização e ainda, à presença de neuromediadores (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007; Wong, D. *et al.*, 2009).

A função sensorial da pele é traduzida por vários recetores do tato (localizados na epiderme e nas papilas dérmicas) e da dor, calor, frio e de pressão na derme em tecidos, que se encontram mais em profundidade (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007; Wong, D. *et al.*, 2009).

A imunidade cutânea é levada a cabo pelas células de Langerhans e pelas citocinas produzidas pelos queratinócitos. O desempenho das suas funções imunitárias resulta da sua interação com as células sanguíneas - os linfócitos - que circulam na pele (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

A função metabólica da pele inclui a produção de vitamina D logo após a exposição à radiação ultravioleta. Esta vitamina desempenha uma função de elevada relevância a nível ósseo, uma vez que é ela a responsável por estimular o consumo do ião cálcio e do ião fosfato a nível intestinal, promovendo a sua libertação nos ossos e reduzindo a perda de cálcio a partir dos rins e ainda, aumentando os níveis séricos de cálcio e fosfato (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

Relativamente à manutenção da homeostasia, que a pele vai ter a capacidade de realizar, permitirá capacitar a manutenção da temperatura corporal aproximadamente a 37°C (condições corporais internas), independentemente das condições externas experimentadas pelo Homem (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

Anatomicamente a pele é constituída por duas camadas distintas, firmemente unidas entre si: a epiderme e a derme. Trata-se de um órgão resistente, flexível, plástico,

relativamente impermeável, que contém uma elevada capacidade de autorreparação. É importante realçar, que para além das variadas funções já referidas, possui também a capacidade de realizar trocas diretas com o meio envolvente. É ainda constituída por duas camadas tecidulares: a epiderme e a derme (Prista, N. L. *et al.*, 2008).

A epiderme é a primeira camada exterior e é constituída por epitélio pavimentoso estratificado especial. A segunda, é a derme, também designada por *cútis* ou *córion*, situada imediatamente abaixo da epiderme. A derme é contínua em geral, com o tecido celular laxo subcutâneo, o qual forma por sua vez a hipoderme, habitualmente caracterizada por ser muito rica em tecido adiposo (Prista, N. L. *et al.*, 2008).

É a partir da hipoderme que podem surgir os vários apêndices cutâneos tais como: folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. São estes apêndices que irão atravessar todas as camadas da pele até atingir a superfície (Seeley, R. R. *et al.*, 2003 ).

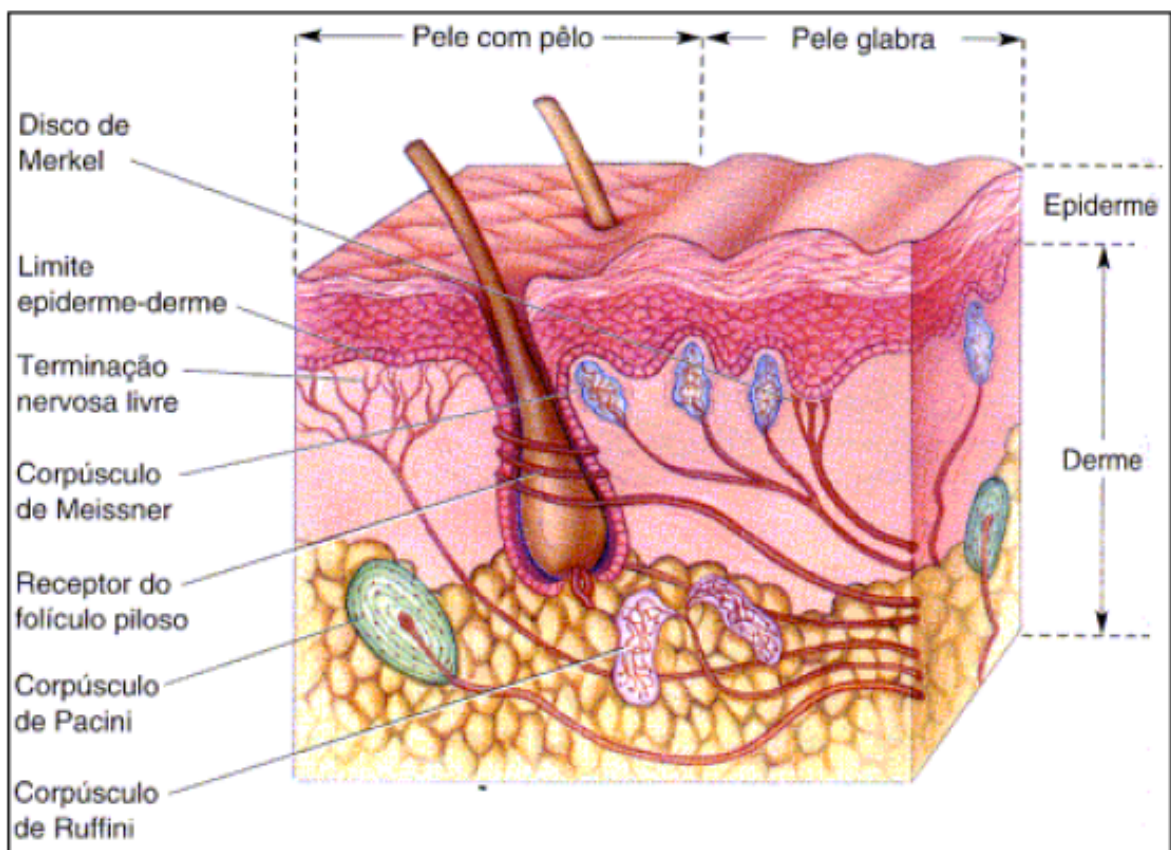


Figura 1- Representação esquemática da pele humana (retirado de <http://www.afh.bio.br>).

## 4.2. Epiderme

É constituída por epitélio de revestimento pavimentoso estratificado e tem como função principal produzir várias camadas de células, que envolvem inteiramente e revestem toda a superfície da pele, de forma a protegê-la das agressões externas (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Wong, D. *et al.*, 2009).

Não se trata de uma camada tão espessa como a derme e não contém vascularização, ficando a sua nutrição ao encargo dos capilares da camada basal através de fenómenos de difusão (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

A epiderme é composta por cinco camadas distintas são elas: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granular, estrato espinhoso e camada basal (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

A primeira camada, que se encontra à superfície, o estrato córneo (ou camada córnea), é constituído por várias camadas de células (aproximadamente 25 camadas) desprovidas de núcleo e achatadas, os queratinócitos. Os queratinócitos são as células por excelência da epiderme e são caracterizadas por serem células com uma composição extremamente rica em queratina. Os queratinócitos resultam da deslocação (ocorre geralmente a cada 19 dias aproximadamente) até à superfície dos vários componentes epiteliais, desde camadas mais profundas. Concomitantemente a essa deslocação, estas componentes epiteliais sofrem todo um processo de degenerescência e morte celular. Na zona circundante às células encontram-se lípidos libertados pelos corpos lamelares, que irão ser responsáveis por conferir características de permeabilidade à pele. O conteúdo hídrico desta camada é muito reduzido, apresentando apenas 7 a 20% da quantidade total de água na pele (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Prista, N. L. *et al.*, 2008).

Segue-se o estrato lúcido, também designado por camada de transição. Este estrato é composto por células translúcidas, justapostas e ricas em eleidina (substância química precursora da queratina). Este estrato apenas se encontra nas zonas onde a pele é mais espessa, nomeadamente na planta dos pés e das mãos (Prista, N. L. *et al.*, 2008).

O terceiro estrato, o estrato granular, é constituído entre duas a cinco camadas de células losangulares. Estas células losangulares possuem no seu citoplasma grânulos proteicos dispersos de queratohialina daí a designação dada a este estrato (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

O seguinte estrato é o espinhoso, com oito a dez camadas de células poligonais ou multifacetadas. Como este estrato não apresenta grande divisão celular, o que se faz frequentemente é designar a camada basal e a espinhosa conjuntamente, numa camada única designada por estrato germinativo. Por último, na epiderme, iremos ter a camada basal ou estrato basal, constituído por uma única camada de células cúbicas ou cilíndricas (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

A epiderme está separada da derme através desta membrana basal. Esta membrana possui duas funcionalidades, fazer de barreira e de filtro, permitindo assim, a passagem dos nutrientes necessários à nutrição de todas as células localizadas acima, na epiderme, uma vez que a epiderme é avascularizada. É também responsável, por garantir a fixação de toda a estrutura da epiderme, através de hemidesmosomas, que fixam a epiderme à membrana basal e por desmosomas, que mantêm a coesão entre os queratinócitos (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Prista, N. L. *et al.*, 2008).

Nesta camada mais profunda da epiderme (camada basal), encontramos também umas células denominadas de melanócitos, cuja funcionalidade principal é a produção de melanina. Nos mamíferos este pigmento, que constitui a pele, os cabelos e a coróide ocular tem como objetivo a proteção contra as radiações ultravioleta. As restantes células da epiderme incluem as células de Merkel, responsáveis por funções sensoriais (tato) pois, encontram-se associadas a terminações nervosas e as células de Langerhans, que desempenham funções imunitárias (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Prista, N. L. *et al.*, 2008).

### 4.3. Derme

Também designada de córion, é constituída por tecido conjuntivo denso e apresenta, dependendo da região corporal, na superfície de contacto com a epiderme, interpenetração, formando-se pequenas saliências designadas por papilas. Estas papilas irão preencher os

espaços onde existem depressões na epiderme, proporcionando assim uma maior área de contacto entre a epiderme e a derme (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Prista, N. L. *et al.*, 2008).

Na sua constituição apresentam fibras de elastina, de colagénio e fibroblastos (células responsáveis pela produção de substância fundamental amorfa). Esta camada é subdividida em duas subcamadas: a derme papilar (camada mais externa, localizada junto à membrana basal) e a derme reticular (camada mais profunda) (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Prista, N. L. *et al.*, 2008).

A derme papilar é mais espessa do que a derme reticular e representa cerca de quatro quintos da totalidade da derme. É extremamente vascularizada, apresentando na sua constituição tecido conjuntivo frouxo, substância fundamental, fibras de colagénio, fibras de elastina e terminações nervosas. É de notar que da derme papilar para a derme reticular observa-se um aumento do número e da espessura das fibras de colagénio e, ainda, uma maior predominância de fibras elásticas (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Prista, N. L. *et al.*, 2008).

O córion é atravessado por dois tipos de glândulas, as sudoríparas e as sebáceas. As glândulas sebáceas estão alojadas na zona superficial da derme e fazem parte, quase na sua totalidade, dos folículos pilosos sendo que, apenas uma em cada dez, aflora directamente à superfície da epiderme. Destes folículos pilosos, que são uma espécie de saco conjuntivo-epitelial, que envolve a raiz do pêlo, sairá o pêlo propriamente dito. Ambas as glândulas constituem uma importante via de penetração de medicação – a via tópica (Prista, N. L. *et al.*, 2008).

#### 4.4. Hipoderme

Esta camada cutânea situa-se imediatamente abaixo da derme reticular e é constituída por duas porções: uma fibro - adiposa (mais exterior) e uma, maioritariamente, fibrosa (mais interna). É uma camada extremamente rica em tecido adiposo, (metade da gordura armazenada no corpo esta localizada na hipoderme e a sua localização corporal vai variar de acordo com a idade, sexo e alimentação) desempenhando por isso funções de reserva, de protecção térmica e amortecedora. É ainda responsável estabelecer a ligação entre a pele os

ossos e os músculos e por lhe fornecer igualmente vasos sanguíneos e nervos (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Wong, D. *et al.*, 2009).

## 4.5. Anexos cutâneos

### 4.5.1. Pêlo

A presença de pêlos é uma característica comum entre todos os mamíferos. O pêlo está dividido em duas partes a haste e a raiz. A haste é a parte do pêlo visível, que se encontra fora da pele e a raiz, é a parte do pêlo que se encontra não visível, localizada por baixo da pele (Seeley, R. R. *et al.*, 2003; Wong, D. *et al.*, 2009).

A estrutura, que contém o pêlo, é designada por folículo piloso, sendo constituída por uma bainha radicular dérmica e uma bainha radicular epitelial (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

### 4.5.2. Glândulas sebáceas

Estão localizadas na derme e são responsáveis pela produção de sebo, uma substância bastante rica em lípidos (gordura), que como tal irá desempenhar o papel de proteção contra bactérias, de lubrificação e de hidratação cutâneas. A grande maioria destas glândulas está unida por um canal ao folículo piloso, com o objetivo de libertar o sebo produzido diretamente no pêlo lubrificando-o a ele e à pele (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

### 4.5.3. Glândulas sudoríparas

Existem dois tipos de glândulas sudoríparas: as écrinas e as apócrinas. As écrinas são as mais comuns no nosso organismo, estando localizadas em toda a superfície corporal, mas em maior número, nas plantas dos pés e das mãos. Anatomicamente podem dividir-se em duas partes: uma porção mais interna glomerular (que irá produzir um líquido isotónico constituído por água, sais minerais, ureia, amoníaco, ácido úrico e ácido láctico), que está localizada na derme e, uma porção superior, que se estende até à superfície cutânea, designada por canal excretor (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

As glândulas sudoríparas apócrinas nos seres humanos, apenas sofrem ativação na puberdade, como resultado da ação da hormonal. Estão localizadas apenas nas axilas e na região perianal. As secreções produzidas por estas, apesar de inodoras, vão sofrer metabolização pelas bactérias saprófitas, dando origem ao odor corporal. As glândulas mamárias incluem-se neste grupo, sendo consideradas glândulas sudoríparas apócrinas modificadas (Seeley, R. R. *et al.*, 2003).

## Capítulo V – A matriz extracelular

### 5.1. O papel da matriz extracelular e a importância da sua inclusão nos substitutos biológicos

A célula animal como célula eucariota não está envolvida por uma parede celular, apenas por uma membrana plasmática, que a protege e delimita do meio externo. Estas células estão embebidas numa matriz, que ocupa os espaços intercelulares, garantindo assim a ligação intercelular. Esta relação biunívoca células – matriz, é entendida como um dos vetores de transmissão de informações entre as células (Azevedo, C. *et al.*, 1999).

A matriz extracelular (MEC) pode definir-se como um aglomerado tridimensional complexo de macromoléculas biológicas, que interagem entre si e se ligam a recetores celulares. Está localizada no espaço intercelular e é constituída por quatro grandes famílias de moléculas: os colagénios, os componentes do sistema elástico, as proteínas multifuncionais e os proteoglicanos/glicosaminoglicanos. Estas moléculas, que compõem a matriz extracelular são sintetizadas, depositadas e degradadas pelas células de um modo muito bem controlado (Azevedo, C. *et al.*, 1999; Brohem, C. *et al.*, 2010 ).

Todas as células têm a capacidade de sintetizar os componentes da matriz, mas a diferente proporção, quer qualitativa quer quantitativamente de cada uma das moléculas anteriormente mencionadas, irá determinar os diferentes tipos de matriz produzida pela globalidade dos tecidos, com funcionalidades diferentes. Existem duas zonas distintas da MEC, o compartimento intersticial e o pericelular. O compartimento intersticial da matriz desempenha essencialmente um papel estrutural, sendo especialmente abundante nos tecidos conjuntivos. Por sua vez, o compartimento pericelular está diretamente ligado aos processos de modulação do comportamento celular, nomeadamente, aos fenómenos de adesão, migração, proliferação, apoptose e diferenciação celulares. O glicocálice, a zona pelúcida e a lâmina basal são alguns exemplos do compartimento pericelular (Azevedo, C. *et al.*, 1999; Brohem, C. *et al.*, 2010).

Resumindo, os tecidos do corpo humano não são apenas constituídos apenas por células, uma parte substancial do seu volume, é de espaço extracelular preenchido por uma rede de macromoléculas, que constituem a MEC. A presença desta rede é crucial no nosso organismo, uma vez que desempenhará uma multiplicidade de funções entre as quais se destacam, o suporte nutricional, estrutural e a regulação comportamental das células (Azevedo C. *et al.*, 1999; Brohem, C. *et al.*, 2010).

Assim sendo, na produção de substitutos biológicos, em engenharia de tecidos existe pois a necessidade de conseguir reproduzir esta matriz extracelular, por forma a garantir um bom e normal funcionamento dos mesmos (Lanza, R. *et al.*, 2007).

## Capítulo VI – Cicatrização da pele

### 6.1. O processo de cicatrização da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. A perda da integridade da pele, devido a algum tipo de lesão ou doenças agudas, que podem potencializar o aparecimento de um desequilíbrio fisiológico, que se não for devidamente tratado poderá resultar numa perda de viabilidade do tecido ou até mesmo na morte do indivíduo (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Segundo a associação americana de queimaduras, a causa mais comum de perda de integridade cutânea, é a lesão térmica, as restantes incluem trauma, úlceras por pressão, ulcerações decorrentes da diabetes *mellitus* e estase venosa (Lanza, R. *et al.*, 2007).

A cicatrização não é de forma alguma um processo tão simples e tão linear, como uma simples libertação de fatores de crescimento para ativar a proliferação e migração celulares. Trata-se pois de uma integração de vários processos interativos e dinâmicos, envolvendo as células parenquimatosas, os elementos figurados do sangue e uma matriz extracelular. Ao longo das três últimas décadas grandes progressos foram feitos para a compreensão de todo o processo envolvido na cicatrização de feridas agudas e crónicas (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Após a ocorrência de uma descontinuidade na pele, ocorre uma resposta inflamatória, produzindo-se manifestações como calor, rubor, tumefação, entre outros. Perante a ocorrência de condições fisiológicas normais, dar-se-á então em seguida, o processo de cicatrização. Este processo divide-se em quatro fases: a fase vascular, a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase remodelativa. Durante todas estas fases haverá uma intervenção celular (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Na fase vascular, poderá haver uma contração dos vasos sanguíneos pela contração do próprio músculo liso vascular ou, pela libertação de catecolaminas, pelo próprio vaso, se houver necessidade fisiológica, isto é, se houver hemorragia (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Entretanto durante a fase seguinte, a fase inflamatória, haverá um aporte de células

sanguíneas ao local, em resultado da resposta inflamatória, uma vez que esta aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos (vasodilatação), facilitando assim, o deslocamento destes elementos celulares até aos locais lesados. De entre os elementos celulares temos, nomeadamente, os leucócitos e as plaquetas, estas últimas, irão continuar o processo de hemostase, já anteriormente iniciado (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Durante o início da fase inflamatória, há uma continuidade dos fenómenos da fase vascular e inicia-se a cascata de coagulação. O processo de coagulação, dá-se devido ao fato de haver libertação de fatores pró-coagulantes, assim que haja uma lesão da parede vascular. A trombina e/ou o colageneo formado(s) durante o combate à hemorragia, são os responsáveis pela ativação das plaquetas, promovendo a sua ativação e conseqüentemente, a sua agregação. Quer pela via intrínseca quer pela via extrínseca, vai-se formar a trombina, que uma vez atuando sobre o fibrinogénio origina a fibrina, esta, conjuntamente, com a fibronectina, irá formar uma matriz contráctil essencial à cicatrização. Nesta matriz irão multiplicar-se e crescer monócitos, fibroblastos e queratinócitos. Entretanto, para além dos monócitos, já se encontram no local outras células, os neutrófilos, que irão ter o seu pico ao fim de 1-2 dias. Estas células irão desempenhar um papel de remoção e desinfeção inata de tecido morto, pela ocorrência de fenómenos de fagocitose, libertação de enzimas proteolíticas e radicais livres. O processo fagocitário é igualmente desempenhado pelos monócitos e principalmente pelas células, em que estes se transformam em macrófagos. Os macrófagos, são grandes células nucleadas com um papel muito significativo em todo o processo de cicatrização, pois vão ser elas que irão produzir inúmeras citoquinas, além de radicais livres e enzimas. As citoquinas ou citocinas, são as proteínas, que vão estimular a migração e proliferação celulares e que, conseqüentemente, levará à formação de tecido de granulação e à produção de matriz extracelular (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Segue-se então a fase proliferativa, onde a epitelização ou reepitelização vai ocorrendo a partir dos bordos da ferida, dos anexos cutâneos ou dos restos de epitélio incluídos na ferida, locais onde ainda existe tecido epitelial (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007) .

Os queratinócitos vão migrar então dos bordos da ferida e anexos cutâneos, devido à ajuda prestada pelos fatores plaquetares, pela fibronectina, pela fibrina, pelo colagénio e pelas citoquinas. Quanto mais distantes forem os bordos da ferida, mais demorado será este trajeto e

subsequentemente, mais demorada será a cicatrização. É importante referir, que quanto mais húmido se encontrar o ambiente, mais favorecido estará o processo migratório dos queratinócitos (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Esta fase possui ainda fenômenos de angiogenese, fibroplasia e contração da cicatriz. A angiogenese ou neovascularização caracteriza-se por ser um fenómeno onde há crescimento de capilares a partir dos vasos adjacentes à ferida, crescimento este que será induzido pelas citocinas produzidas pelas células vizinhas e potenciado pela matriz extracelular. A fibroplasia é levada a cabo pelos fibroblastos, após a sua migração para a ferida, migração esta que será induzida entre outros pela trombina, pelo pH ácido no local e por fatores quimiotáticos. Estes fibroblastos irão então segregar substâncias, que fazem parte da matriz extracelular tais como o colagénio, elastina, fibronectina, proteoglicanos, entre outros (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

A contração da cicatriz ocorre duas semanas depois, pela contração dos miofibroblastos, células resultantes da transformação dos fibroblastos. A  $\alpha$ , que foi produzida por estas últimas células, também tem um papel importante no processo de contração da cicatriz. Os miofibroblastos vão então ser estimulados por compostos como a angiotensina, as catecolaminas, as prostaglandinas de forma a produzir a contração da cicatriz até serem inibidas por compostos, que induzem o relaxamento do músculo liso (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

Finalmente temos a última fase do processo, a fase de remodelação. Nesta fase haverá essencialmente reformulação da matriz extracelular, pois os queratinócitos, os fibroblastos e os macrófagos vão produzir collagenases e proteases que irão permitir uma reposição das percentagens de colagénio. Dá-se nesta fase uma consolidação do colagénio e uma maturação da cicatriz (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007).

É importante referir que todas estas fases podem estar presentes, simultaneamente, em toda a ferida, apesar de estas se sucederem no processo de cicatrização dito normal, pode se dar o caso de ocorrer uma falha em qualquer uma das fases, podendo assim a ferida tornar-se crónica (Langer, R. *et al.*, 2007).



## Capítulo VII – A engenharia de tecidos aplicada à pele

### 7.1. A evolução da engenharia de tecidos aplicada à pele

A pele é uma barreira física e química eficiente no nosso organismo e como tal desempenha um papel importante. A existência de inúmeras e diferentes células na pele, tais como os queratinócitos, melanócitos, fibroblastos e células endoteliais, garantem a sua funcionalidade. Uma vez comprometida ou destruída, esta barreira necessita imediatamente de uma intervenção, que garanta a restituição das suas funções (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009; Wong, D. *et al.*, 2009).

Nos últimos 25 anos grandes esforços foram feitos para criar substitutos biológicos, que consigam simular a pele humana. Estes avanços científicos apenas se tornaram possíveis devido à evolução simultânea da engenharia de tecidos. Até agora a utilidade destes substitutos tem sido bastante variada e tem representado uma vantagem em diversas áreas e aplicações, tais como: na investigação farmacêutica (como um sistema de testes *in vitro*), como modelo de compreensão de todo o processo de cicatrização de feridas, entre outros referenciados mais à frente (Metcalf, A. *et al.*, 2007; Groeber, F. *et al.*, 2011).

No laboratório quando se processa a produção de substitutos da pele, o controlo qualidade desses substitutos, geralmente é realizado previamente à sua transplantação. Até à presente data, existe um número muito limitado de marcadores, que provaram ser representativos e úteis nesta avaliação. O único critério, que parece ter uma influência significativa na avaliação da qualidade do substituto da pele, é a ocorrência de uma vascularização rápida e apropriada após a transplantação (Mansbridge, J. *et al.*, 2008; Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009).

Vários produtos têm vindo a ser lançados no mercado nos últimos anos, alguns para uso permanente, outros para uso temporário. Estes produtos contêm células com diferentes origens (autólogas, alogénicas ou xenogénicas) e materiais biodegradáveis/não biodegradáveis, que constituem os suportes usados para facilitar a ligação e o manuseamento celulares (Mansbridge, J. *et al.*, 2008; Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009).

Existem vários critérios de classificação dos produtos no mercado, que podem ser sumariados de acordo com (Shevchenko, R. *et al.*, 2009):

- A estrutura anatômica, que irão substituir (substitutos epidérmicos, dérmicos ou epidérmicos-dérmicos) ;
- A durabilidade da permanência no local (permanentes, semi-permanentes ou temporários);
- Os componentes celulares presentes/ausentes no substituto (celular ou acelular);
- Origem celular (autólogas, alogénicas ou xenogénicas);
- O local onde ocorrerá a ligação primária ao biomaterial (*in vivo* ou *in vitro*).

A pele uma vez lesionada ou danificada, em situação normal, inicia-se um longo e complexo processo de cicatrização, que restabelece o equilíbrio fisiológico. Contudo se estivermos perante uma situação, em que a cascata de cicatrização seja afetada negativamente, a cicatrização pode sofrer uma desaceleração ou até mesmo não ocorrer, resultando numa ferida crónica. Quando a área afetada é demasiado extensa, há uma maior dificuldade no tratamento com recurso à utilização dos métodos convencionais de tratamento, podendo mesmo ocorrer a morte do paciente. Devido ao surgimento destes novos meios de tratamento foi possível aumentar significativamente a taxa de sobrevivência de indivíduos com áreas lesionadas bastante extensas e impulsionar a qualidade de vida de indivíduos com feridas crónicas (Clark, R. A. F. *et al.*, 2007; Mansbridge, J. *et al.*, 2008; Groeber, F. *et al.*, 2011).

Apesar das melhorias que têm sido verificadas na qualidade dos substitutos, que estão no mercado atualmente, estes ainda não conseguem desempenhar a total funcionalidade da pele, pois ainda não apresentam componentes celulares tais como: melanócitos, linfócitos, macrófagos, nem anexos cutâneos (Metcalf, A. *et al.*, 2007; Shevchenko, R. *et al.*, 2010).

## 7.2. Auto, Xeno e Aloenxertos

Os autoenxertos são os enxertos mais utilizados atualmente na transplantação de pele para o tratamento de feridas e queimaduras, pois em comparação com os aloenxertos e xenoenxertos não apresentam limitações, tais como: rejeição imunológica, risco de transmissão de algum agente patogénico e tempo limitado de permanência *in vivo*, pelo simples facto da biopsia recolhida ter origem no próprio indivíduo que a vai receber. Neste caso o tipo de células utilizado na cultura celular efetuada *in vitro*, são os queratinócitos (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Como exemplos de autoenxertos atualmente no mercado temos: Epicel®/ Epibase®, Laserskin®, CellSpray®, Myskin® (Thomsen, P. *et al.*, 2008).

No caso dos aloenxertos o que se verifica em termos de procedimento, difere dos autoenxertos na origem da biopsia recolhida, que neste caso se efetua a partir de um indivíduo geneticamente diferente, mas da mesma espécie que o recetor e no tipo de células utilizado na cultura celular efetuada *in vitro*, neste caso trata-se de fibroblastos (Thomsen, P. *et al.*, 2008).

Geralmente estes aloenxertos utilizados para a preparação de substitutos têm que ser previamente tratados com antifúngicos, antibacterianos e álcool etílico, a fim de poder eliminar qualquer agente patogénico passível de ser transmitido pelo dador ao recetor e possa causar infeção (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Os aloenxertos podem-se incluir em duas categorias: nos substitutos dérmicos ou nos substitutos compostos, também designados por substitutos epidérmicos-dérmicos. Os aloenxertos ainda podem ser por sua vez classificados, como substitutos acelulares ou celulares (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Nos que toca aos aloenxertos dérmicos acelulares, estes são obtidos a partir de um doador humano e são tratados de forma a remover todos os possíveis interferentes capazes de desencadear uma reação imunológica. Uma vez prontos estes aloenxertos dérmicos, são colocados no leito da ferida e vão funcionar como se tratasse de um andaime para a atividade

dos fibroblastos do hospedeiro e consequente crescimento/formação do novo tecido. Como exemplos de aloenxertos dérmicos acelulares, pode-se indicar: AlloDerme® e DermaMatrix® (Lanza, R. *et al.*, 2007).

No caso dos aloenxertos dérmicos celulares, as células do doador são usadas apenas para criar um suporte estrutural. Uma vez criada esta estrutura ela irá ser semeada com fibroblastos do doador, que irão ser responsáveis por sintetizar proteínas e outros componentes da matriz extracelular, servindo assim como um estímulo às células do hospedeiro na promoção do processo de cicatrização. Como exemplos de aloenxertos dérmicos celulares pode-se indicar: Dermagraft® e TransCyte® (Lanza, R. *et al.*, 2007).

No caso dos xenoenxertos o que se verifica em termos de procedimento, é a utilização de tecidos com origem em células recolhidas a partir de uma outra espécie geneticamente diferente da do receptor e, como tal, apenas serão utilizados como enxertos temporários no tratamento de feridas. Alguns exemplos de produtos incluem o Permacol® e Matriderme® (Lanza, R. *et al.*, 2007).

Geralmente estes enxertos utilizados para a preparação de substitutos têm que ser igualmente previamente tratados com antifúngicos, antibacterianos e álcool etílico de forma a poderem eliminar qualquer agente patogénico passível de causar infeção no recetor (Lanza, R. *et al.*, 2007).

### 7.3. Aplicações *in vivo*

Os substitutos cutâneos produzidos podem ser utilizados para o tratamento de várias lesões epidérmicas, dérmicas ou eventualmente poderão ser utilizados para tratar lesões mais extensas, que atinjam ambas as camadas cutâneas (Groeber, F. *et al.*, 2011).

#### 7.3.1. Aplicações *in vivo* - substitutos epidérmicos

Nas aplicações *in vivo*, os substitutos epidérmicos são exclusivamente autólogos e permitem tratar efetivamente lesões ao nível da camada epidérmica. O procedimento para a

preparação de um autoenxerto epidérmico inicia-se com uma biopsia da pele do próprio paciente, este pequeno fragmento de pele será então tratado enzimaticamente (digestão enzimática) de forma a remover a membrana basal e assim poder possibilitar a separação da epiderme da derme. Posteriormente segue-se um isolamento celular ao nível da epiderme (queratinócitos). Os queratinócitos isolados do tecido do próprio paciente vão então ser colocados *in vitro* numa cultura celular para que ocorra a sua expansão, juntamente com fatores de crescimento. Só posteriormente é que irão ser semeados no suporte para que ocorra o desenvolvimento do substituto epidérmico (Mansbridge, J. *et al.*, 2008; Groeber, F. *et al.*, 2011).

A etapa chave para a construção deste tipo de substitutos é a que envolve o isolamento dos queratinócitos a partir de uma biopsia recolhida do paciente, uma vez que os queratinócitos serão futuramente as células responsáveis pelo crescimento *in vivo* da camada epidérmica (Groeber F. *et al.*, 2011).

Desde a biopsia realizada à pele do próprio paciente, até à obtenção do substituto epidérmico final, decorrem cerca de três semanas, daí que seja necessário iniciar-se um tratamento com recursos mais convencionais até se poder obter o substituto epidérmico para que a superfície da derme, esteja apta a receber o substituto da epiderme, pois a correta ligação deste substituto irá depender da qualidade e das condições em que se encontra a camada subjacente da derme (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009)

As características dos produtos comercializados mais utilizados são:

- Epicel®/Epibase® - ambos são produzidos utilizando os queratinócitos do próprio paciente (autólogos), queratinócitos esses que provieram da pequena biopsia realizada à pele do paciente. São os substitutos epidérmicos mais antigos e por isso ainda apresentam várias limitações associadas, tais como: o elevado tempo de espera até a obtenção do enxerto, fracos resultados obtidos a longo prazo, a necessidade da existência de um suporte dérmico, enxertos muito frágeis e finos, o elevado custo e um prazo de validade do enxerto bastante curto. Mas apesar das suas limitações estes substitutos têm grande aplicabilidade no tratamento de pacientes com queimaduras extensas (Shevchenko, R. *et al.*, 2010);

- Myskin® - é um produto que apresenta na sua constituição queratinócitos autólogos num suporte de silicone revestido por um filme polimérico de plasma, que irá apoiar a expansão celular. Esta constituição contendo o filme polimérico irá permitir a libertação das células aí sediadas no momento da implantação deste produto no leito da ferida, promovendo o processo de cicatrização. As vantagens deste produto incluem: maior facilidade de manipulação, de aplicação e ainda uma redução do tempo gasto na cultura celular. Este produto encontra-se indicado para o tratamento de úlceras de pressão, neuropáticas, no pé diabético e ainda no tratamento de queimaduras superficiais (Shevchenko, R. *et al.*, 2010);
  
- Laserskin® - consiste num produto em que os queratinócitos autólogos são cultivados numa membrana microperfurada a laser e composta por 100% de ácido hialurónico. A existência de microperfurações vai então permitir a migração dos queratinócitos até ao leito da ferida. A presença do ácido hialurónico na membrana microperfurada irá promover o processo de cicatrização no local lesionado. Uma vez que o ácido hialurónico não é mais do que um polímero natural sintetizado pela matriz extracelular, que possui a capacidade de estimular e promover a migração e a proliferação celulares. Ensaio clínicos efetuados comprovaram a sua grande potencialidade uma vez que apresenta elevada biocompatibilidade e baixo risco de infeção no tratamento de úlceras venosas, diabéticas e queimaduras (Shevchenko, R. *et al.*, 2010);
  
- CellSpray® - esta tecnologia consiste na colheita dos queratinócitos autólogos, da cultura celular realizada, no seu estado mais ativo de proliferação, seguida da sua pulverização no leito da ferida. Este tipo de procedimento adotado irá permitir a confluência da proliferação e diferenciação celulares *in vivo* de forma a garantir a formação de uma estrutura epitelial e o fechamento da ferida. As vantagens da utilização deste produto incluem, o pouco tempo gasto na cultura celular e uma mais rápida cobertura da ferida pelos queratinócitos, numa fase de proliferação ativa, o que irá permitir uma ação mais rápida na cicatrização. Este produto tem se vindo a mostrar bastante eficaz no tratamento de pacientes com

úlceras crônicas, com incidência na melhoria da qualidade de vida destes pacientes (Shevchenko, R. *et al.*, 2010).

### 7.3.2. Aplicações *in vivo* - substitutos dérmicos

Nas aplicações *in vivo*, os substitutos dérmicos, são na sua maioria alogénicos e subdividem-se em duas categorias: os acelulares e os celulares, que são constituídos por sua vez por fibroblastos, que em contraste com os epidérmicos, podem prevenir a contração da ferida e conseguem garantir uma maior estabilidade mecânica (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Os substitutos dérmicos acelulares apresentam um menor risco de rejeição imunológica, uma vez que a biopsia do doador será previamente tratada de forma a remover qualquer possível interferente capaz de desencadear uma reação imunológica (Shevchenko, R. *et al.*, 2010).

Estes substitutos vão promover o restauro da derme pela promoção do crescimento de um novo tecido e pela otimização das condições de cicatrização. Quando ocorre lesão dérmica, surge obrigatoriamente, lesão epidérmica, então o que se verifica é que após a transplantação do substituto dérmico este terá que ser coberto impreterivelmente, por um substituto epidérmico para que se conclua o processo de cicatrização da pele (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009).

A biopsia da pele do doador terá que ser tratada enzimaticamente (digestão enzimática) de forma a remover a membrana basal e assim poder possibilitar a separação da epiderme da derme. Posteriormente, segue-se um isolamento celular ao nível da derme (fibroblastos). Os fibroblastos isolados do tecido do doador vão então ser colocados *in vitro* numa cultura celular para que ocorra a sua expansão, juntamente com fatores de crescimento (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Estes substitutos dérmicos serão então incorporados diretamente na ferida e uma vez aplicados irão ser colonizados e vascularizados pelas células subjacentes, formando-se finalmente a “nova” derme. Ao fim de 3-4 semanas, assim que haja vascularização suficiente,

poderá então ser colocada a fina camada de enxerto epidérmico, por cima da nova derme formada (Groeber, F. *et al.*, 2011).

As características dos produtos comercializados mais utilizados são:

- AlloDerm® - não é mais do que um enxerto acelular alogénico, que sofre um tratamento químico, de forma a garantir que não haja a presença de elementos capazes de despoletar uma reação imunológica, que leve à rejeição do enxerto por parte do recetor. É um substituto bastante utilizado no tratamento de lesões causadas por queimaduras, pelos excelentes resultados que têm vindo a ser obtidos (Shevchenko, R. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011);
- Dermagraft® - este produto é um substituto celular temporário, constituído por uma combinação de fibroblastos alogénicos, proteínas da matriz extracelular e citoquinas, que ao atuarem diretamente na ferida, facilitam e aceleram toda a dinâmica do processo de cicatrização das feridas. Devido às características por ele apresentadas, é bastante utilizado na fase inicial do tratamento das úlceras no pé diabético (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009);
- TransCyte® - é um substituto celular temporário composto por fibroblastos alogénicos cultivados *in vitro* numa malha de nylon. Esta malha de nylon é previamente revestida com colageneo suíno e ligada a uma membrana polimérica de silicone. Os fibroblastos ao mesmo tempo que proliferam dentro da malha de nylon, irão segregar colagénico dérmico, proteínas e fatores de crescimento, promovendo a cicatrização. Como é um substituto temporário atua como uma barreira de proteção temporária para a ferida, a justificação para a sua curta permanência no local, surge ligada é ao facto de os materiais que o compõem, serem sintéticos e não biodegradáveis, obrigando assim, à sua retirada 7-14 dias após a sua aplicação. A aplicação deste substituto tem sido feita em pacientes com queimaduras com bastante sucesso (Shevchenko, R. *et al.*, 2010);
- Hyalograft 3D® - é composto por fibroblastos autólogos que possuem a

capacidade de produzir citocinas e fatores de crescimento e desta forma vão ter a capacidade de estimular e acelerar a dinâmica de todo o processo de cicatrização. Os fibroblastos autólogos irão crescer numa membrana microperfurada constituída por ácido hialurónico permitindo assim a migração dos fibroblastos até ao leito da ferida. A presença do ácido hialurónico na membrana microperfurada irá promover o processo de cicatrização no local lesionado, uma vez que o ácido hialurónico não é mais do que um polímero natural sintetizado pela matriz extracelular, que possui a capacidade de estimular e promover a migração e a proliferação celulares. Quanto às suas aplicações mais comuns, incluem-se as úlceras e as queimaduras (Shevchenko, R. *et al.*, 2010);

- Matriderme® - substituto dérmico xenogénico temporário constituído por uma matriz composta por elastina e colagénico. A presença destas duas proteínas da matriz extracelular irá servir como um suporte para a ocorrência da cicatrização e reconstituição cutâneas. Particularmente a elastina poderá melhorar a estabilidade e a elasticidade da nova camada formada. A aplicação deste substituto tem vindo a demonstrar bastante eficácia pelos resultados até agora obtidos, quer a nível cosmético quer a nível fisiológico. A sua utilização tem sido feita em combinação com outros substitutos autólogos no tratamento de queimaduras (Shevchenko, R. *et al.*, 2010).

### 7.3.3. Aplicações *in vivo* - substitutos epidérmicos-dérmicos

Nas aplicações *in vivo*, os substitutos epidérmicos-dérmicos são os substitutos no mercado mais sofisticados, pois são aqueles que conseguem substituir as duas camadas da pele em simultâneo, a epiderme e a derme e, podem ainda também, ser designados de substitutos compostos (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Os produtos existentes no mercado com essa finalidade incluem queratinócitos e fibroblastos incorporados em suportes apropriados e, embora sejam considerados substitutos muito completos, são considerados como temporários (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009).

São maioritariamente utilizados para o tratamento de feridas crónicas e estudos efetuados neste campo permitiram aferir, que indivíduos com feridas crónicas tratadas com substitutos epidérmicos-dérmicos tiveram uma rápida e boa cicatrização das respetivas feridas. Após alguns ensaios clínicos foi ainda possível, comparar as cicatrizes deixadas após tratamentos mais convencionais e ainda o tratamento com substitutos epidérmicos-dérmicos, que em termos de aparência, as cicatrizes deixadas por estes últimos, manifestam-se sempre menores e com melhor aparência (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados positivos manifestados, possuem, no entanto, duas grandes limitações inerentes ao facto de ser necessária a produção de um substituto epidérmico. A primeira limitação prende-se com o elevado tempo de espera, cerca de 4 semanas, desde a biopsia até ao momento em que substituto possa ser transplantado e, em segundo lugar, o seu elevado custo de fabrico, o que não os torna muito atrativos para a indústria (Böttcher-Haberzeth, S. *et al.*, 2009).

As características dos produtos comercializados mais utilizados são:

- Apligraf® - é um substituto alogénico em bicamada, constituído por células vivas e proteínas estruturais tal e qual como a pele humana. Na camada que irá substituir a derme teremos, os fibroblastos alogénicos vivos, a crescer numa matriz constituída por colagénio bovino tipo I. No caso da epiderme, a camada superior, será formada pela multiplicação e diferenciação dos queratinócitos alogénicos vivos. A expansão e a cultura celular dos fibroblastos e dos queratinócitos alogénicos ocorre em separado, as células resultantes dessa cultura é que vão ser utilizadas posteriormente para a produção *in vitro* do substituto. Na sua composição contem ainda proteínas da matriz extracelular, mas apesar de ser um substituto que já se assemelha bastante à pele humana, ainda não contem as várias células cutâneas nem os anexos cutâneos presentes na pele humana. Esta aplicação tem sido bastante utilizada para o tratamento de úlceras venosas e diabéticas, pela sua elevada eficácia e rapidez no tratamento destas feridas, que tem demonstrado, tem ainda, uma vida útil limitada (é um substituto temporário), mas permite, que possa ser aplicado um novo substituto a cada 4-6 semanas consoante indicação médica (Groeber, F. *et al.*, 2011);

- TissueTech Autograft System (Hyalograft® + Laserskin®) - é um substituto que tem uma aplicação permanente, pois é constituído por fibroblastos e queratinócitos autólogos. Tem duas partes; o substituto dérmico – Hyalograft® e o substituto epidérmico - Laserskin®, mas como este produto resulta da combinação de dois substitutos, não é considerado um “verdadeiro” substituto epidérmico-dérmico (Groeber, F. *et al.*, 2011).

#### 7.4. Substitutos permanentes versus temporários

A tolerância imunogénica do recetor é um grande problema, que se coloca no que respeita à utilização destes substitutos biológicos. Esta questão tem vindo a ser bastante discutida e tem se mostrado bastante controversa, uma vez que a efetividade do tratamento com este tipo de substitutos irá depender diretamente da tolerância imunogénica verificada pelo sistema imunitário do recetor. O que se pode concluir através de ensaios clínicos realizados neste âmbito foi, que no que toca aos fibroblastos, eles são bem tolerados pelo recetor, quer sejam autólogos quer sejam alogénicos, podendo por isso serem utilizados em substitutos permanentes, mas já no que toca aos queratinócitos, não existe rejeição, caso estes sejam autólogos, mas a situação é outra, se estes forem alogénicos, pois neste caso, existe uma grande probabilidade de rejeição por parte do recetor, claro, se houver uma permanência prolongada no local. Por isso para substitutos permanentes, é frequente o uso dos queratinócitos autólogos e/ou fibroblastos alogénicos ou autólogos, a fim de poder evitar a ocorrência de reações de rejeição por parte do recetor (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Quanto aos substitutos temporários o que se verifica é que não existe um risco elevado de rejeição pela curta permanência no local, podendo por isso, ser utilizados, quer fibroblastos e queratinócitos alogénicos quer fibroblastos e queratinócitos autólogos (Groeber, F. *et al.*, 2011).

A utilização de materiais não biodegradáveis e sintéticos, na produção destes substitutos, também podem ser limitantes, no que toca ao tempo de permanência no local e, no caso de serem biodegradáveis, a sua permanência no local é ilimitada no tempo, mas caso

sejam utilizados materiais sintéticos e não biodegradáveis, já a aplicação destes substitutos, no local, será apenas temporária (Shevchenko, R. *et al.*, 2010).

### 7.5. Aplicações *in vitro*

O desenvolvimento de pele humana através da engenharia de tecidos, teve como objetivo inicial a substituição da pele de indivíduos, onde esta se encontrava danificada ou comprometida, ou seja, para a sua própria aplicação *in vivo* (Groeber, F. *et al.*, 2011).

No entanto, o seu elevado potencial *in vitro*, tem vindo a ser uma ferramenta bastante útil em inúmeros campos, visto que os substitutos criados podem ser utilizados como um modelo de estudo e ainda, também, para a realização de testes. No entanto, se os testes forem realizados através de métodos convencionais, serão necessários inúmeros testes de toxicidade, o que encarece a investigação e aumenta o tempo gasto em prol da mesma. Se estes testes forem realizados *in vitro*, estes modelos de pele humana, têm demonstrado ser uma alternativa bastante viável e vantajosa, particularmente, em termos de custo-efetividade (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Uma das vantagens da utilização destes substitutos de pele humana produzidos *in vitro* prende-se ao facto de poder apresentar uma composição celular passível de ser manipulada pelo próprio investigador, o que permite assim, adaptar os substitutos, consoante o tipo de estudo em questão o que poderá facultar ainda, uma produção em larga escala (Groeber, F. *et al.*, 2011).

Mas ainda há muito a fazer neste campo, uma vez que apesar de os substitutos se assemelharem à pele humana existem, claramente, diferenças marcantes quando comparadas com a pele humana. Futuramente o desenvolvimento de substitutos de pele para aplicação *in vitro* poderá incluir ainda, os melanócitos, linfócitos, macrófagos e anexos cutâneos (glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos) de forma a poder garantir uma melhor e mais correta experimentação (Groeber, F. *et al.*, 2011).

### 7.5.1. Aplicações *in vitro* - Indústria Farmacêutica e Cosmética

Atualmente muitos fármacos e cosméticos são aplicados topicamente. No entanto, um grande número de substâncias permanecem ainda uma incógnita, no que toca à sua capacidade em conseguir atingir o local alvo para poderem exercer a sua ação (Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

Em estudos farmacológicos recentes, realizados *in vitro*, os substitutos da pele são um modelo fidedigno para poder avaliar a absorção tópica de fármacos e identificar também, possíveis agentes químicos com propriedades irritantes, tóxicas ou corrosivas, desde que estejam em contacto com a pele. Além disso, é também importante avaliar se o fármaco em questão terá apenas ação local ou se terá a capacidade de entrar no sistema circulatório, para conseguir exercer uma ação sistémica (Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

Outra área em que estes substitutos têm tido bastante ênfase, é na investigação dos danos e nas repercussões da exposição às radiações ultravioleta (UV). Neste campo, o estudo e o desenvolvimento de produtos de proteção solar apresenta, cada vez mais, resultados positivos, ligados a uma capacidade acrescida de proteção da pele e ainda, simultaneamente, à prevenção de danos celulares capazes de originar o aparecimento de um melanoma. Neste âmbito podem ainda ser utilizados, como um modelo de teste, que contribua para o surgimento de novos fármacos para o tratamento de melanomas (Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

A aplicação de fármacos tópicos, conjuntamente com a exposição à radiação ultravioleta, pode ainda resultar numa reação de fototoxicidade. A utilização destes substitutos de pele *in vitro* permite surgir novos estudos sobre potenciais compostos fototóxicos, que por sua vez, podem prever e antecipar ainda a ocorrência destas reações e possibilitar a sua substituição, desde que seja possível, por outras, desde que não apresentem fotossensibilidade (Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

### 7.5.2. Aplicações *in vitro* - cicatrização de feridas

Embora o processo de cicatrização *in vivo* envolva mais componentes celulares do que apenas os fibroblastos e os queratinócitos, estes modelos de pele humana podem ajudar a compreender em detalhe tudo o que se passa durante a cicatrização de uma ferida. Para uma melhor extrapolação dos resultados obtidos em laboratório têm vindo a ser feitos inúmeros esforços de forma a poder melhorar a qualidade e a semelhança com a pele humana dos substitutos cutâneos (Groeber, F. *et al.*, 2011).

### 7.5.3. Aplicações *in vitro* - doenças e infeções cutâneas

Na pele, a interação entre os queratinócitos, os fibroblastos, os melanócitos e as células do sistema imunitário, são altamente controladas por vários fatores. Qualquer tipo de rutura que possa surgir por via destas interações, pode resultar em afeções cutâneas, como por exemplo, a psoríase (uma proliferação incontrolada de queratinócitos). Estes modelos de teste têm vindo a ser utilizados em estudos *in vitro* com o objetivo de desenvolver novas moléculas, com o objectivo de poder atingir-se uma terapia mais efetiva no tratamento do eczema psoriático (Tjabringa, G. *et al.*, 2008; Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

Estes substitutos têm também vindo a ser utilizados no estudo da fisiopatologia associada, às infeções causadas por vários vírus, tais como o papilomavírus, o adenovírus e herpes simplex, para estudar a forma de propagação do melanoma, no cancro cutâneo, às células circundantes (Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

### 7.5.4. Aplicações *in vitro* - uma alternativa a testes em animais

Os animais têm vindo a ser bastante utilizados como modelo de estudo, pois permitem testar novos fármacos, antes mesmo destes serem colocados no mercado, de forma a poder facilitar, a compreensão dos efeitos resultantes da aplicação/utilização desses fármacos. No entanto, a sua utilização, como cobaias nos últimos anos, tem sido bastante mais restrita e

controlada nos testes, pela sua ligação a questões éticas e legais, surgindo a necessidade então, de se criar métodos alternativos à utilização de animais como cobaias. Uma alternativa bastante promissora e em voga actualmente, passa pela utilização de substitutos da pele *in vitro* como modelo de teste de fármacos (Brohem, C. *et al.*, 2010; Lebonvallet, N. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

Neste contexto estes substitutos de pele não são só importantes para tratar lesões ao nível da pele, mas também, como um modelo de investigação para se poder testar a toxicidade de novas moléculas a nível tópico. A utilização de animais como cobaias apresenta várias limitações, pois ainda são bastante notórias as diferenças estruturais e metabólicas da pele destes, quando comparada com a pele humana (Brohem, C. *et al.*, 2010; Groeber, F. *et al.*, 2011).

## Capítulo VIII – Conclusão

Este estudo procurou fazer o ponto de situação e avaliar sobre a engenharia de tecidos e, em particular, da engenharia de tecidos para a regeneração da pele, aproveitando ainda a oportunidade para realizar uma breve retrospectiva, sobre esta matéria e ainda lançar algumas perspectivas para o seu futuro.

A engenharia de tecidos tem um elevado potencial de mercado e como tal, o investimento nesta área tem vindo a crescer de uma forma gradual e sustentada. Apesar disso, a indústria ligada à produção destes substitutos, ainda terá de enfrentar inúmeros desafios de forma a poder conseguir aperfeiçoar cada vez mais as características dos substitutos, garantindo assim, uma melhor performance dos mesmos, com o objectivo de assegurar a total segurança por parte do recetor.

Neste contexto busca-se alcançar num futuro próximo, poder conseguir obter um maior aproveitamento, sobre o que o seu potencial representa para a cura de certas doenças até agora tidas como incuráveis, ou ainda, numa melhor qualidade de tratamento de doenças, cujos cuidados actualmente disponíveis, ainda não são suficientes e eficazes face às solicitações actuais.

Neste âmbito, certamente, a área da medicina nos próximos anos, terá uma palavra a dizer face à evolução positiva e em exponencial, consubstanciada relativamente à melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Quanto às células tronco, as reais impulsionadoras desta área da biotecnologia, ainda muito haverá muito a fazer pois, será necessária uma flexibilidade operacional para poder compreender o funcionamento global destas células, a fim de que se possa usufruir de todas as suas potencialidades.

Já no que toca ao caso particular das células tronco embrionárias, importará também ultrapassar os obstáculos surgidos, que se ligam a questões de ética, pois não tem sido fácil na actualidade, abordar esta matéria, sem que não surjam mais limitações, originadas pela

própria comunidade ligada à ética.

Relativamente aos suportes até agora criados, para concretizar o crescimento dos tecidos, as condições do suporte têm vindo a ser melhoradas e optimizadas. Já no que diz respeito aos biomateriais utilizados para a produção destes suportes, destaca-se, cada vez mais, a procura e a utilização dos que apresentam *in vivo* biodegradabilidade, maior biocompatibilidade e baixa toxicidade para o organismo do receptor.

Os suportes têm vindo a registar grandes avanços tecnológicos, facto que tem optimizado a sua performance *in vivo*, no entanto, e apesar disso, permanecem algumas limitações, tais como: os elevados custos associados à sua produção e dos biomateriais utilizados, a rejeição imunológica, a toxicidade, entre outros, mas que a longo prazo, deverão ser ultrapassados.

No caso particular da engenharia de tecidos aplicada à pele, inúmeros pacientes têm já beneficiado do recurso ao uso destes substitutos *in vivo*, nomeadamente, no tratamento de queimaduras, lesões crónicas, entre outras, apresentando assim, resultados muito positivos.

Relativamente aos substitutos cutâneos, estes têm mostrado grande aplicabilidade não só *in vivo*, mas também *in vitro*, nomeadamente, serem bastante úteis na investigação, com o objectivo de poderem testar a toxicidade e a capacidade de absorção de fármacos a nível tópico, assumindo-se como alternativa aos testes realizados em animais e ainda, como modelo de estudo da fisiologia de várias afecções dermatológicas.

Embora se tenha vindo a verificar uma evolução e um aperfeiçoamento destes substitutos cutâneos, que tem permitido cada vez mais, que eles se possam assemelhar à pele humana e também, o facto de não possuírem alguns anexos cutâneos, como pêlos ou glândulas sudoríparas, acrescendo ainda, uma deficiente vascularização, resultante da experimentação verificada por estes substitutos, tem constituído um obstáculo difícil de ultrapassar, pois daí podem acarretar limitações sérias para as suas próprias aplicações quer *in vivo* quer *in vitro*.

Num futuro cenário próximo espera-se, que se torne possível, a produção de substitutos cutâneos integrados com folículos pilosos e glândulas sudoríparas, facto que permitirá então, assim, que estes substitutos, possam desempenhar as funções cutâneas na sua plenitude totalidade, quer seja *in vivo* quer *in vitro*.

Esse caminho longo a ser trilhado, com certeza, irá originar novos substitutos possíveis a serem utilizados. Neste âmbito e em jeito de expectativas a serem concretizadas a curto prazo, espera-se, que esses novos substitutos se tornem cada vez mais similares à pele humana de forma a garantir o total e correto funcionamento, a nível fisiológico dos mesmos, tal como se tratasse de uma pele humana original.

Neste contexto, a engenharia de tecidos será então, sem sombra de dúvida, a área da biotecnologia, que nos próximos anos irá sofrer de uma evolução mais gradual sustentada. A concretizar-se, este cenário, irá materializar-se, em resultado das graduais e prementes necessidades médicas actuais, ligadas a novos campos de investigação e, muito em particular, às do campo da cirurgia.

Em síntese, que não definitiva, dos dados que foram analisados, poder-se-á perspectivar, que a engenharia dos tecidos, será certamente a área, onde num futuro muito próximo, será sentido o maior impacto no que respeita à prática de cuidados de saúde, constituindo, por isso, uma ferramenta de excelência fundamental para o tratamento de doenças e desequilíbrios, que o corpo humano pode padecer.

## Capítulo IX – Referências bibliográficas

Azevedo, C. *et al.* (1999). Matriz extracelular. *In: Azevedo, C. (Ed.). Biologia Celular e Molecular.* 3ª Edição. Lousã, LIDEL, pp. 65-79.

Bacakova, L. *et al.* (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnology Advances*, 29, pp. 739-767.

Bajada, S. *et al.* (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative, *Journal of tissue Engineering and regenerative medicine*, 2, pp. 169-183.

Barbanti, S., Zavaglia, C., Duek, E. (2005). Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, *Polímeros : Ciência e Tecnologia*, 15(1), pp. 13-21.

Böttchen-Haberzeth, S. *et al.* (2010). Tissue engineering of skin, *Burns*, 36, pp. 450-460.

Brohem, C. *et al.* (2010). Artificial skin in perspective: concepts and applications, *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24, pp. 35-50.

Clark, R. *et al.* (2007). Tissue Engineering for Cutaneous Wounds, *Journal of Investigative Dermatology*, 127, pp. 1018- 1029.

Groeber, F. *et al.* (2011). Skin tissue engineering - *in vivo* and *in vitro* applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128, pp. 352-366.

Ikada, Y.(2006). Challenges in tissue engineering, *Journal of the royal society*, 3, pp. 589-601.

Lanza, R. *et al.* (2007).The challenge of imitating Nature. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering.* 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 7-14.

Lanza, R. *et al.* (2007). Future Perspectives *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue*

*engineering*. 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 33-42.

Lanza, R. *et al.* (2007). Biodegradable Polymers. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*. 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 323-339.

Lanza, R. *et al.* (2007). Three- dimensional Scaffolds. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*. 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 341-358.

Lanza, R. *et al.* (2007). Embryonic stem cells. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*. 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 421-429.

Lanza, R. *et al.* (2007). Wound repair. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*. 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 1149-1161.

Lanza, R. *et al.* (2007). Bioengineered skin constructs. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*. 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 1167-1185.

Lanza, R. *et al.* (2007). Tissue- Engineered skin products. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*, 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 1202-1213.

Lanza, R. *et al.* (2007). The tissue- engineering industry. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*, 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 1265-1270.

Lanza, R. *et al.* (2007). Ethical Issues. *In: Lanza, R.(Ed.). Principles of tissue engineering*, 3ª Edição. China, Academic Press, pp. 1281-1287.

Lebonvallet, N. *et al.* (2010). The evolution and use of skin explants: potential and limitations of dermatological research, *European Journal of Dermatology*, 20(6), pp. 671-684.

Liu, C. *et al.* (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Chemical Engineering Research and Design*, 85, pp. 1051-1064.

Mansbridge, J.(2008). Skin tissue engineering, *Journal of biomaterials science*, Polymer edition, 19(8), pp. 955-968.

Metcalfe, A. *et al.* (2007). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterial, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration, *Journal of the royal society*, 4, pp. 413-437.

Paspala, S. *et al.* (2011). Pluripotent stem cells - A review of the current status in neural regeneration, *Neurol India*, 59, pp. 558-565.

Prista, N. *et al.* (2008). Administração de medicamentos. *In: Prista, N.(Ed.). Tecnologia Farmacêutica I Volume. 7ª Edição.* Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 93-99.

Seeley, R. Stephens, T., Tate, P. (2003). Sistema Tegumentar. *In: Seeley, R.(Ed.). Anatomia & Fisiologia. 6ª Edição.* Loures, Lusociência, pp. 150-162.

Sharples, F. *et al.* (2003). Adult stem cells. *In: Sharples, F.(Ed.). Stem cells and the future of regenerative Medicine.* Washington DC, National Academy Press, pp. 19-30.

Sharples, F. *et al.* (2003). Embryonic stem cells. *In: Sharples, F.(Ed.). Stem cells and the future of regenerative Medicine.* Washington DC, National Academy Press, pp. 31-40.

Sharples, F. *et al.* (2003). Oportunities and barriers to progress in stem cell research for regenerative medicine. *In: Sharples, F.(Ed.). Stem cells and the future of regenerative Medicine.* Washington DC, National Academy Press, pp. 41-54.

Shevchenko, R. *et al.* (2010). A review of tissue engineerd skin reconstruction, *Journal of the royal society*, 7, pp. 229-258.

Thomsen, P. *et al.* (2008). Stem cells. *In: Blitterswijk, C.(Ed.). Tissue Engineering.* Canada, Academic Press, pp. 1-26.

Thomsen, P. *et al.* (2008). Natural polymers in tissue engineering applications. *In:*

Blitterswijk, C.(Ed.). *Tissue Engineering*. Canada, Academic Press, pp. 145-192.

Thomsen, P. *et al.* (2008). Tissue engineering for skin transplantation. *In*: Blitterswijk, C.(Ed.). *Tissue Engineering*. Canada, Academic Press, pp. 507-532.

Tjabringa, G. *et al.* (2008). Development and validation of human psoriatic skin equivalents, *The American Journal of Pathology*, 173 (3), pp. 815-823.

Willerth, S. *et al.*(2008). Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery.[Em linha]. Disponível em: <http://www.stembook.org/node/582>. [Consultado em 29/10/2011].

Wong, D. *et al.* (2009). Skin tissue engineering. [Em linha]. Disponível em: <http://www.stembook.org/node/586>. [Consultado em 27/10/2011].