

**FACULDADE DE FÁRMACIA
UNIVERSIDADE DE LISBOA**



**FACULDADE DE
FARMÁCIA**
Universidade de Lisboa

A Engenharia do tecido hepático

Nélida Eurides Mendes Cabral

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2008-2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FÁRMACIA



A Engenharia do tecido hepático

Nélida Eurides Mendes Cabral

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2008-2009

ÍNDICE:

1- INTRODUÇÃO.....	6
2- MÉTODOS.....	7
3- DESENVOLVIMENTO	8
3.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO.....	8
3.2 AS FUNÇÕES DO FÍGADO	10
3.3 A CAPACIDADE REGENERATIVA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS E A NECESSIDADE DE UM FÍGADO ARTIFICIAL	12
3.4 PRINCÍPIOS DA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	15
3.5 A ENGENHARIA DO TECIDO HEPÁTICO.....	17
3.6 TIPOS DE CÉLULAS	18
3.6.1 OS HEPATÓCITOS HUMANOS	19
3.6.2 AS CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS (HESCs)	19
3.6.3 AS CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS	20
3.6.4 AS CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS	20
3.6.5 AS CÉLULAS ESTAMINAIS HEPÁTICAS ADULTAS	21
3.7 OS SUPORTES	21
3.8 ENGENHARIA DOS TECIDOS IN VITRO/ IN VIVO	24
3.9 SISTEMAS DE CULTURA	25
3.10 POTENCIAIS APLICAÇÕES CLÍNICAS DA ENGENHARIA DOS TECIDOS	26
3.11 ENSAIOS CLÍNICOS	29
4- CONCLUSÕES/ DISCUSSÃO:	31
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

Resumo

Actualmente, o transplante hepático é o único tratamento definitivo para a insuficiência hepática em doenças terminais do fígado.

As limitações no campo do transplante hepático são ainda várias e por isso terapias alternativas e inovadoras como a engenharia do tecido hepático têm vindo a ser investigadas.

A combinação de polímeros biodegradáveis e células com o objectivo de reparar ou regenerar tecidos está a ser continuamente investigada e várias estratégias têm sido desenvolvidas nesta abordagem.

O recurso a células estaminais pode ser uma grande ajuda para ultrapassar o problema de escassez de órgãos.

Mais investigações serão necessárias para estabelecer as melhores condições e sistemas de transplante para o desenvolvimento de tecido hepático artificial e funcional para uma potencial aplicação clínica.

Palavras-chave: Engenharia do tecido hepático • Transplante hepático • Doença hepática.

Abstract

Today, liver transplantation is still the only curative treatment for liver failure due to end-stage liver diseases.

In the field of liver transplantation there are still many limitations. Thus, alternative innovative cell-based liver directed therapies, for example, liver tissue engineering, are under investigation.

The use of biodegradable scaffolds combined with cells or biological molecules to repair and/or regenerate tissues is the approach of tissue engineering. These constructs are under intense investigation and various strategies are continually being developed.

The use of stem cells might be very attractive to overcome the limitation of donor liver tissue and liver specific differentiation of embryonic, fetal or adult stem cells is currently under investigation.

Future studies have to investigate which environmental conditions and transplantation system would be most suitable for the development of artificial functional liver tissue including blood supply for a potential use in a clinical setting.

Keywords: Hepatic tissue engineering • liver transplantation • liver diseases

1- INTRODUÇÃO

O fígado é um importante órgão do organismo onde ocorre a síntese proteica e o metabolismo de substratos endógenos e exógenos. As doenças crônicas do fígado constituem um sério problema de saúde mundial, tendo em conta que mais de 20 milhões de pessoas vivem com estas doenças.

Actualmente o transplante hepático é o único tratamento definitivo para as doenças terminais do fígado. No entanto, a escassez de doadores e outras limitações como os custos elevados e a necessidade de terapia de imunossupressão, têm levado a que alternativas inovadoras como a **engenharia do tecido hepático** estejam a ser investigadas no sentido de criar tecido hepático artificial que possa substituir as funções desse órgão nos doentes crónicos.

A maioria dos tecidos e órgãos com determinada estrutura tridimensional, requerem um suporte para a sua formação a partir de células. Assim, para o funcionamento e diferenciação das células hepáticas é necessária uma matriz extracelular artificial que permita a formação de tecido novo, com propriedades favoráveis ao transplante.

A fonte celular tem uma grande influência no sucesso da engenharia dos tecidos. O vantajoso potencial de crescimento de diferentes tipos de células estaminais fetais hepáticas está demonstrado, mas a sua utilização clínica depende de questões éticas e legais. A utilização de células estaminais hematopoiéticas e mesenquimatosas também tem sido muito investigada, apesar da fusão celular observada em determinadas experiências *in vivo* com estas últimas ser uma desvantagem.

Estudos clínicos demonstraram a importância do transplante de células hepáticas durante a crítica fase de disfunção da hepatite fulminante, quer permitindo que o fígado tenha essa recuperação, quer como um sistema temporário até que o transplante do órgão por inteiro seja efectuado. Apesar dos resultados positivos, a avaliação da eficácia clínica destes procedimentos deve ser cuidadosa e mais estudos terão que ser feitos para investigar as melhores condições e sistemas de transplante para o desenvolvimento de tecido hepático funcional para uma potencial aplicação clínica.

2- MÉTODOS

O objectivo da pesquisa bibliográfica foi obter dados actuais sobre a engenharia do tecido hepático e os desafios ainda por ultrapassar no sentido de criar um novo órgão para uma futura utilização na clínica.

A pesquisa electrónica de artigos relacionados foi feita com base nas palavras-chave “hepatic tissue engineering”, “liver transplantation” e “liver diseases”, e foram também consultados alguns “abstracts”. Foram escolhidas as publicações com informação mais actualizada e relevante.

Também se recorreu à consulta de determinados documentos (livros, teses de doutoramentos e artigos de revisão) para aprofundar conhecimentos.

O objectivo do trabalho definiu o critério de selecção de toda a informação.

3- DESENVOLVIMENTO

3.1 Anatomia e histologia do tecido hepático

O fígado é a maior glândula do corpo humano, com um peso aproximado de 1500 g no adulto. Está situado na parte superior direita da cavidade abdominal, por baixo do diafragma e protegido pelas últimas costelas. De uma cor vermelha escura, consistência mole e superfície lisa, está envolto por uma fina membrana fibrosa, denominada cápsula de Glisson, e pelo peritoneu.

Embora seja um órgão compacto, podem-se distinguir no fígado diversas partes ou lóbulos. O maior é o lóbulo direito, separado do lóbulo esquerdo por uma prega do peritoneu denominada ligamento falciforme; na parte inferior, verificam-se outros dois mais pequenos: o lóbulo caudado e o lóbulo quadrado.¹

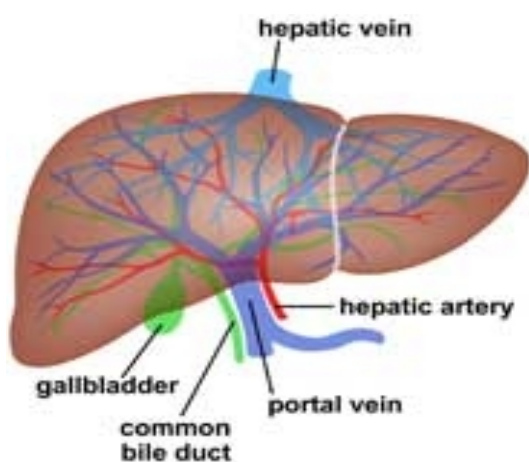


Fig. 1 - A vascularização hepática. Imagem obtida em www.cpmc.org/images/liver.

Pela parte inferior do fígado, através de um sulco denominado hilo hepático, penetram no órgão dois grandes vasos: a **artéria hepática** e a **veia porta**, que transporta o sangue vindo do tubo digestivo e do baço. Estes vasos ramificam-se repetidamente no interior do fígado, formando uma rede extremamente complexa de **capilares sanguíneos**, que entram em contacto com

cada uma das células hepáticas, com as quais mantêm um abundante intercâmbio de substâncias, para finalmente confluir e constituir as **veias supra-hepáticas** que

emergem na parte superior do órgão e trazem o sangue vindo do fígado para a veia cava inferior.²

Por um lado, é preciso que as células especializadas do órgão, os **hepatócitos**, estejam em contacto íntimo com as ramificações da veia porta e da artéria hepática, uma vez que é delas que obtêm as substâncias nutritivas. Por outro lado, é necessário que estejam também em contacto com canais pelos quais possam trazer a sua secreção, a bÍlis.

Assim, o fígado pode subdividir-se em múltiplos e pequenos **lóbulos hexagonais**, com uma tríade portal em cada canto. Em cada uma destas formações existe um espaço central, denominado fissura porta, cujas paredes são formadas pelos **hepatócitos** e por onde passa uma **ramificação da veia porta**, outra da **artéria hepática** e um **pequeno canal biliar**.¹

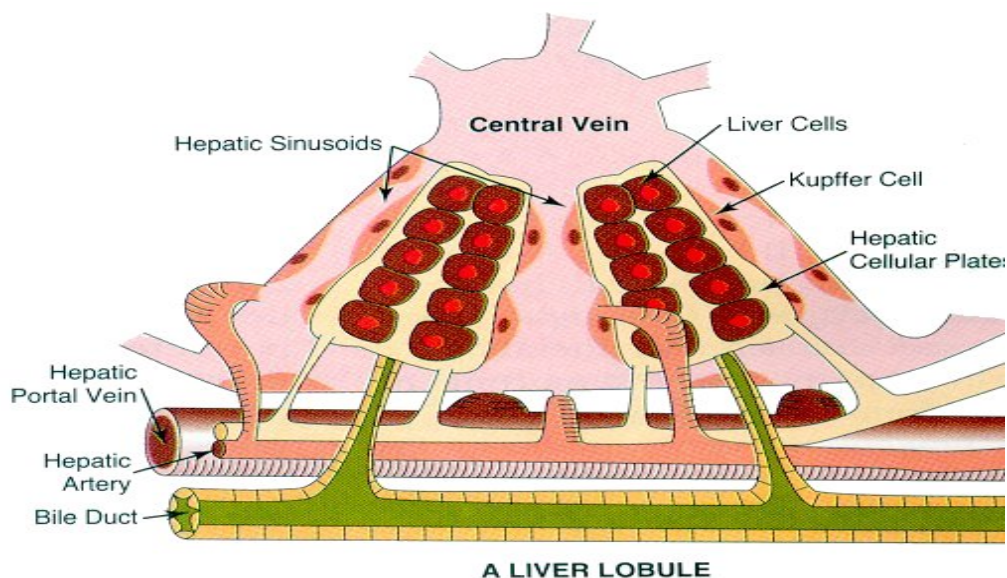


Fig. 2 - O lóbulo hepático. O sangue arterial e portal misturam-se nos sinusóides e fluem na direcção da veia central. A bÍlis flui no sentido oposto, rumo ao ducto biliar. Imagem obtida em www.cpmc.org/images/liver.

As ramificações da veia porta e da artéria hepática fundem-se e constituem as **sinusóides**, uma espécie de lagos de sangue rodeados de **células endoteliais** e fagocitárias (**células de Kupffer**), que se estendem até ao centro do pequeno lóbulo para chegarem a uma pequena veia, denominada **veia centrolobular**, que se vai unindo com as que vêm de outros pequenos lóbulos para formar as veias supra-hepáticas.

Entre as trabéculas de hepatócitos encontram-se delgadíssimos canalículos que recolhem a secreção biliar. Os múltiplos canalículos convergem para formar os pequenos **canais biliares** que, por sua vez, se vão unir entre si até constituir canais maiores - os ductos. Estes (direito e esquerdo) unem-se para formar um ducto comum que transporta a bÍlis para fora do fígado.²

3.2 As funções do fígado

O fígado desempenha importantes funções digestivas e excretoras, armazena e processa os nutrientes, sintetiza novas moléculas e elimina substâncias tóxicas do organismo.

Produção da bÍlis

O fígado produz e secreta diariamente cerca de 600-1000 mL de bÍlis. Embora não contenha enzimas digestivas, a bÍlis desempenha importantes funções a nível da digestão. O pH do quimo que abandona o estômago é muito baixo para permitir o normal funcionamento das enzimas pancreáticas. A bÍlis ajuda a neutralizar o quimo acÍdico e aumenta o pH para que as enzimas possam actuar. Os sais biliares emulsionam a gordura.

A bÍlis também cont m productos do metabolismo como a bilirrubina resultante da degrada o da hemoglobina. O colesterol, as hormonas lipossolúveis e outras gorduras são outros dos constituintes da bÍlis.³

Armazenamento de substâncias

Os hepatócitos têm a capacidade de remover o a o car do sangue e armazená-lo sob a forma de glicog nio, contribuindo assim para a manuten o dos níveis de glucose no sangue. Também podem armazenar gorduras, vitaminas (A, B₁₂,D,E e K), Cobre e Ferro. A quantidade de substâncias armazenadas flutua ao longo do dia.⁴

Interconversão de nutrientes

O fígado pode interconverter alguns nutrientes noutros consoante as necessidades do organismo. Numa dieta excessivamente proteica e pobre em lípidos por exemplo, os hepatócitos utilizam os aminoácidos para produzirem adenosina trifosfato, glucose e lípidos. A produ o de fosfolípidos e da vitamina D activa, são outros exemplos em que algumas substâncias são combinadas para que as células as possam utilizar.³

Destoxifica o

Os hepatócitos alteram a estrutura de várias substâncias tornando-as menos tóxicas ou mais fáceis de se eliminar. A am nia por exemplo, um producto do metabolismo dos aminoácidos,   uma substância muito tóxica para o organismo e que os rins não eliminam prontamente. Os hepatócitos removem-na da circula o, convertem-na em ureia, permitindo a sua elimina o pelos rins.²

Fagocitose

As células de Kupffer alojadas nas paredes dos sinusóides hepáticos fagocitam glóbulos brancos e vermelhos disfuncionais, algumas bactérias e outras substâncias que chegam ao fígado através da circulação.⁴

Síntese

Para além dos seus próprios componentes, o fígado produz várias proteínas do sangue como a albumina, fibrinogénio, globulinas, heparina e factores de coagulação, que são posteriormente libertados para a circulação.²

3.3 A capacidade regenerativa das células hepáticas e a necessidade de um fígado artificial

Sempre que ocorra um dano, os hepatócitos têm a capacidade de entrar rápida e eficazmente no ciclo celular. É possível perder cerca de 75% deste tecido (por doença ou intervenção cirúrgica), sem que ele pare de funcionar.⁵

No entanto, em casos de **patologia hepática persistente**, como é o caso das doenças crónicas no homem, o stress proliferativo permanente envelhece prematuramente os hepatócitos, extinguindo a sua capacidade replicativa. Neste caso, as células progenitoras hepáticas (ovais) aparecem como uma rica população de pequenas células redondas distribuídas pelo parênquima. Estas células revelaram-se potenciais progenitoras tanto dos hepatócitos como das células biliares, estando envolvidas na regeneração do fígado quando a proliferação dos hepatócitos é parcial ou totalmente ineficaz.⁶

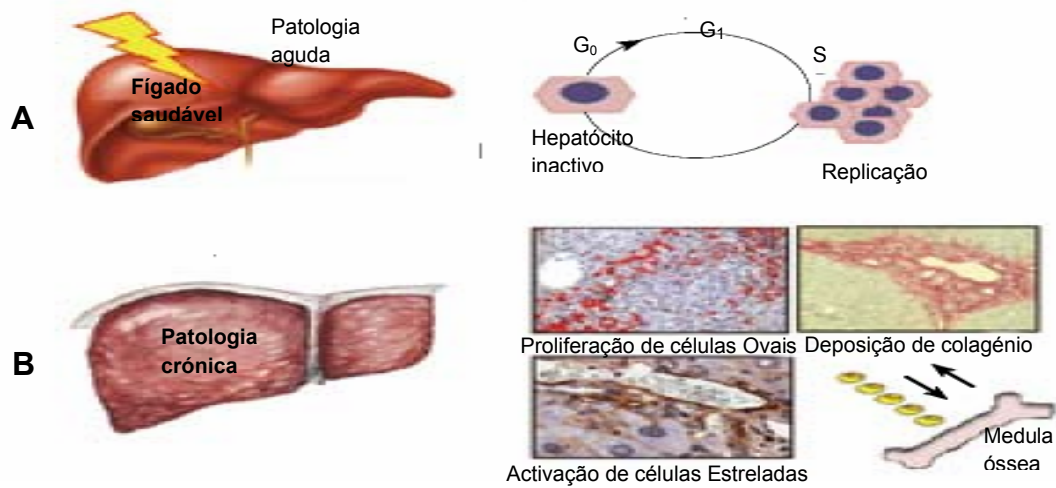


Fig. 3 – A capacidade regenerativa do fígado. (A) Em condições fisiológicas normais e (B) em caso de patologias crónicas.⁵

A contribuição das células estaminais provenientes da medula óssea para a regeneração tecidual nas doenças crónicas do fígado está ainda a ser investigada. A descoberta de marcadores hematopoiéticos (CD34 e Sca-1) nas células ovais, está na origem da teoria que defende a existência de um tráfico activo de células estaminais entre o fígado e a medula óssea, estando esta envolvida na regeneração do órgão.⁵

Apesar de existirem várias **causas de doença hepática**, como o consumo exagerado de álcool, drogas ou medicamentos, as infecções virais e patologias

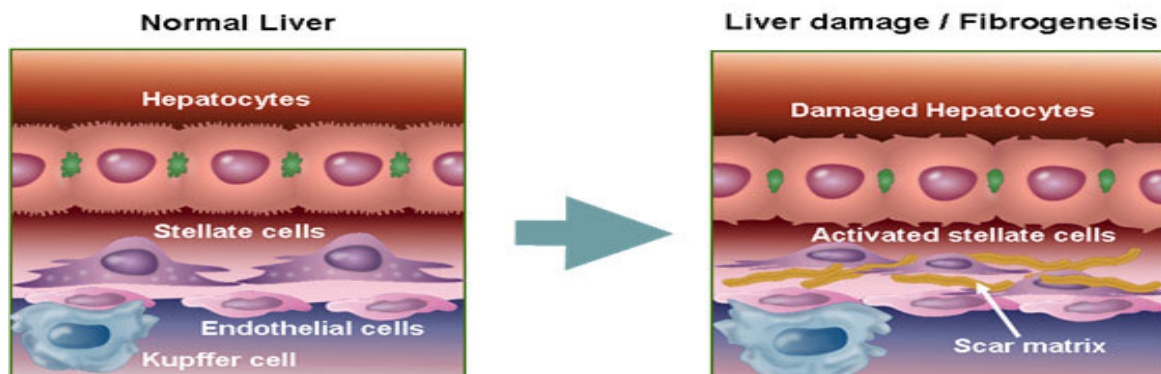


Fig. 4 - Desenvolvimento de cirrose hepática num fígado danificado. Imagem obtida em www.cpmc.org/images/liver.

hereditárias, a progressão dos danos que eventualmente levarão à insuficiência hepática ocorre pelas mesmas vias. As patologias crónicas do fígado provocam graves danos nos hepatócitos que constituem a grande maioria das células hepáticas e são responsáveis pelas importantes funções metabólicas desempenhadas pelo órgão, levando à substituição das mesmas por tecido fibroso, resultando em cirrose.

Nos adultos, a cirrose é a razão mais frequente para transplante hepático. Já nas crianças, a atresia biliar é o que mais frequentemente leva a este procedimento. Nesta patologia, os ductos biliares estão danificados ou ausentes e a biliar obstruída impede a eliminação de produtos indesejáveis do fígado bem como o transporte até ao intestino delgado dos sais biliares necessários para a digestão das gorduras. Dentro desse quadro, o fluxo do fígado até à vesícula biliar se encontra bloqueado. Isto pode causar lesões no fígado e cirrose hepática. Outras razões para transplante podem incluir cancro, tumores benígnos e patologias hereditárias. Por vezes não se consegue determinar a causa da doença hepática.

Todos os anos cerca de 26000 pessoas morrem nos Estados Unidos devido a doenças terminais do fígado.⁷ Actualmente, o **transplante hepático** é o único tratamento definitivo para a insuficiência hepática nestes casos. Anualmente, são efectuados cerca de 5000 transplantes hepáticos. No entanto, a escassez de dadores, os custos elevados e a necessidade de terapia de imunossupressão para toda a vida, constituem sérios obstáculos ao transplante hepático.⁸

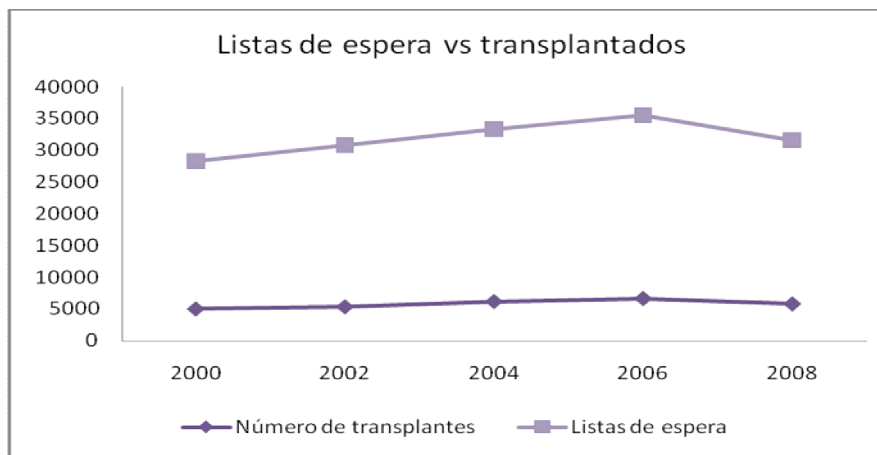


Fig. 5 - A discrepância entre o número de doentes em listas de espera versus transplantes de fígado efectuados nos Estados Unidos da América entre 2000 e 2008, de acordo com a UNOS. Obtida em www.unosdatabase.gov

É neste contexto que tem-se vindo a observar um crescente interesse na **medicina regenerativa**, a qual envolve esforços multidisciplinares para a reparação ou substituição de tecidos danificados. Terapias inovadoras baseadas em células e direccionadas para o fígado, tem vindo a ser investigadas e o **transplante de hepatócitos** com recurso à **engenharia de tecidos** foi proposto em alternativa ao transplante do órgão por inteiro, como resposta a várias formas de insuficiência hepática, e com o objectivo de criar **tecido hepático artificial** para substituir as funções do fígado nesses doentes tendo em conta o já referido problema da escassez de doadores.⁹

3.4 Princípios da Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos pode ser definida como a produção de substituintes biológicos que reproduzam uma ou mais funções de um determinado tecido e/ou órgão que possam ser usados para fins de diagnóstico ou terapêutica. A utilização

de materiais biológicos e sintéticos e a complexidade do processo fazem com que os conceitos de engenharia sejam muito importantes a este nível.¹⁰

Os tecidos obtidos por este processo devem incorporar:

- Células, para desempenharem as funções biológicas
- Factores de crescimento
- Matriz artificial, para providenciar suporte físico e/ou estímulo químico.

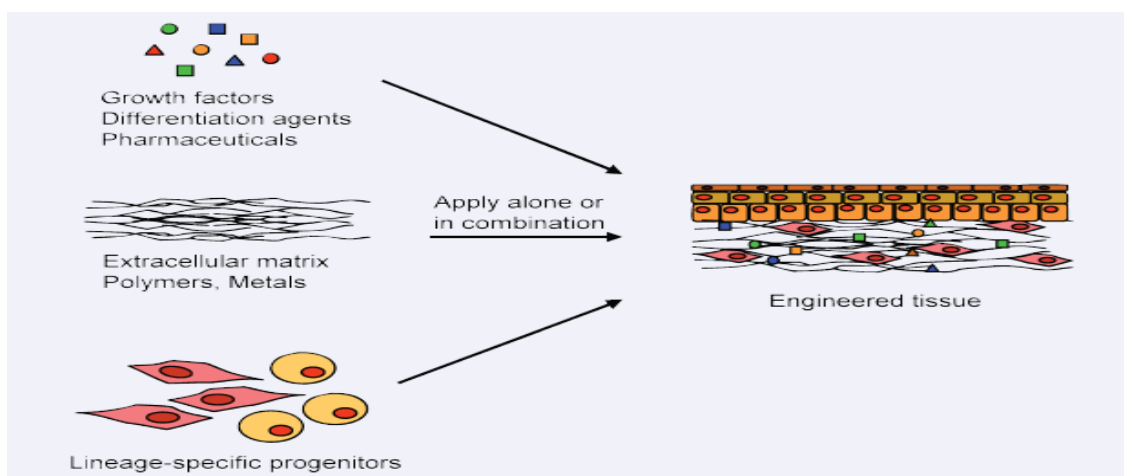


Fig. 6 - Componentes da engenharia de tecidos. Os factores de crescimento medeiam o crescimento e diferenciação celular. Os suportes providenciam um microambiente a 3D para integração e diferenciação celular. Progenitores exógenos com capacidade regenerativa melhoram a sobrevivência *in vivo* do tecido construído.¹⁰

Na engenharia dos tecidos, o princípio geral é primeiramente implantar as **células** em **suportes** biodegradáveis, para posterior cultura *in vitro* ou implante *in vivo*. O ideal seria que o suporte se degradasse gradualmente, deixando apenas o novo tecido gerado pelas células. Assim, as células e os biomateriais são cruciais para o sucesso da regeneração tecidular.¹¹

Apesar de todos os esforços e investigações no sentido de regenerar vários tecidos, a fonte celular, a construção de suportes, as condições de cultura e os modelos animais mais apropriados, constituem ainda factores críticos neste processo de regeneração tecidular.

3.5 A engenharia do tecido hepático

A extensa capacidade regenerativa dos hepatócitos e o seu papel-chave nos processos metabólicos têm proporcionado grande interesse pelo fígado como um alvo interessante para a Engenharia dos tecidos.¹²

Idealmente, as **células** para os sistemas hepáticos bioartificiais deverão ter funções similares às dos hepatócitos humanos adultos, mantendo uma boa actividade proliferativa, bem como a viabilidade a longo prazo. Nestes sistemas, os hepatócitos estão implantados num dispositivo extracorporal, o qual pode ser conectado ao sistema circulatório do doente. No entanto, este sistema é apenas uma forma de assegurar um nível temporário da função hepática, até ao funcionamento completo do órgão transplantado.¹³

Para sobrevivência, reorganização, proliferação e funcionamento do hepatócito, é necessária uma **matriz extracelular insolúvel** e um meio óptimo para se desenvolverem. Os hepatócitos são células extensamente metabólicas, pelo que necessitam igualmente de um adequado **aporte nutricional e rápido acesso ao oxigénio.**¹⁴

Com base nestes princípios, a engenharia do tecido hepático tem vindo a ser desenvolvida no sentido de criar tecido hepático artificial funcional, para uma potencial aplicação clínica.

3.6 Tipos de Células

A fonte celular tem uma grande influência no sucesso da engenharia dos tecidos. Esta, deve idealmente ser não imunogénica, funcional e de fácil cultura. Hepatócitos adultos, células estaminais hematopoiéticas, células ovais progenitoras e células derivadas do hepatoblastoma são alguns exemplos de células que podem ser utilizadas na engenharia do tecido hepático.⁸

De acordo com a origem, as células para transplante podem ser classificadas como autólogas (provenientes do próprio doente), alogénicas (obtidas de dadores humanos) e xenogénicas (de origem animal), sendo as primeiras as mais apropriadas para a engenharia de tecidos devido ao risco de rejeição imunológica das células alogénicas e xenogénicas, originando tecidos que requerem terapia imunossupressora.¹⁵ A classificação também pode ser feita com base na extensão da sua diferenciação. As células estaminais embrionárias indiferenciadas, têm a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular, com ilimitado potencial de expansão. Por outro lado, alguns tecidos nos adultos contém células progenitoras com capacidade proliferativa e que se diferenciam para originar outras, específicas do órgão.⁸ A resposta dos hepatócitos aos danos no fígado é um exemplo desta situação. Estas células progenitoras parecem ter a sua diferenciação limitada a uma linhagem bem definida (não são pluripotentes). Também candidatas são as células estaminais fetais ou adultas . São exemplos destas, as células estaminais

mesenquimatosas e as hematopoiéticas da medula óssea, sendo estas últimas as mais estudadas. As células mesenquimatosas em relação às embrionárias, tem a vantagem de serem mais seguras pois não há o risco de desenvolvimento de teratomas quando transplantadas antes da diferenciação em certas linhagens. Isto sugere que a diferenciação completa e purificação das células modificadas a partir das células estaminais embrionárias, são pré-requisitos para a aplicação clínica destas. Por outro lado, as células hematopoiéticas não demonstraram risco de tumorigenese na aplicação clínica, e a medula óssea apenas regenera tecidos específicos do sitio onde as células foram transplantadas.¹⁵

O desafio está em conseguir um elevado nível de proliferação das células estaminais, mantendo sempre o grau inicial de diferenciação.

3.6.1 Os hepatócitos humanos

Os hepatócitos constituem a maior parte das células do fígado e a sua capacidade de diferenciação é um factor determinante na regeneração do órgão. Assim, a produção de hepatócitos é o principal alvo da engenharia do tecido hepático, sendo que, o desenvolvimento e transplante deste tecido, contendo **hepatócitos humanos primários**, tem-se revelado promissor no tratamento da insuficiência hepática aguda no modelo animal. Estes tecidos, permitem a fixação de células transplantadas e limitam a sua migração para outros órgãos, constituindo assim uma melhoria nos métodos de transplante. Apesar disso, há uma grande dificuldade no isolamento e crescimento *in vitro* de hepatócitos primários.

3.6.2 As células estaminais embrionárias (hESCs)

Estas células têm o potencial de originar todos os tipos de células somáticas a partir de uma determinada linhagem.¹⁰ Actualmente, constituem o melhor modelo *in vitro*

para a diferenciação de hepatócitos. No entanto, as restrições éticas e a possibilidade de desenvolvimento de malignidade limitam grandemente a sua aplicação clínica.¹⁶

Em condições bem definidas, após indução pelo factor de crescimento do hepatócito (HGF) e dos fibroblastos (FGF-4) , as hESCs revelaram capacidade de se diferenciar em células hepáticas funcionais. No entanto, a eficácia deste processo deverá ser aumentada para que a produção de hepatócitos com utilização clínica, a partir das hESCs, seja possível.¹⁷

3.6.3 As células estaminais mesenquimatosas

Actualmente estas células podem ser obtidas a partir de vários tecidos como a medula óssea, o tecido adiposo e o cordão umbilical. Muito há ainda para esclarecer sobre as suas funções e comportamento *in vivo*. São altamente proliferativas *in vitro*, facilmente tranfectáveis, resistentes à criopreservação, tendo um elevado potencial de diferenciação. A grande vantagem destas células reside no facto de serem menos imunogénicas e capazes de induzir tolerância.¹⁶

3.6.4 As células estaminais hematopoiéticas

As células estaminais hematopoiéticas são capazes de se autorenovarem e proliferarem permitindo a regeneração tecidular, mesmo após transplante. Podem ser isoladas a partir da medula óssea, cordão umbilical e sangue periférico, o que as torna extremamente acessíveis, embora difíceis de expandir *in vitro*. A sua plasticidade (possibilidade de fusão celular) o seu uso na clínica.¹⁶

3.6.5 As células estaminais hepáticas adultas

Apesar da identidade e funções *in vivo* desta população de células permanecer ambígua, podem-se considerar quatro principais tipos de células hepáticas progenitoras: as células ovais, os pequenos hepatócitos, as células epiteliais hepáticas e as células mesenquimatosas.

As células ovais aparecem na árvore biliar como resposta a um dano hepático. Tanto podem diferenciar-se em células hepáticas como biliares, podendo também ser expandidas *in vitro*. As pequenas células hepáticas também têm capacidade proliferativa *in vitro* e podem diferenciar-se em hepatócitos maduros *in vitro*.

As células epiteliais hepáticas são capazes de se diferenciarem *in vivo* em células como os hepatócitos. Já as células mesenquimatosas apresentam elevados níveis de proliferação e tal como as células mesenquimatosas estaminais, um grande potencial de diferenciação. Quanto às semelhanças relativamente às propriedades imunológicas, têm que ser mais investigadas.¹⁶

3.7 Os suportes

A maioria dos tecidos e órgãos com determinada estrutura tridimensional, requerem um suporte para a sua formação a partir de células. Este suporte é denominado **matriz extracelular artificial ou molde**. A sua principal função é permitir a proliferação, diferenciação e biossíntese da célula, prevenindo a invasão de células vizinhas e direccionando a formação do tecido novo no processo de regeneração.¹⁸

As funções e a diferenciação das células hepáticas são altamente influenciadas pela arquitectura tridimensional do órgão, pelo que o conceito de engenharia de tecidos

como uma combinação de células e matrizes tridimensionais altamente porosas, revela-se muito mais vantajoso do que a injeção de suspensões celulares em órgãos sólidos. O transplante de células em matrizes poliméricas é um procedimento reversível se desejável, ao contrário do que se passa quando se injectam células em determinadas estruturas anatómicas.⁸

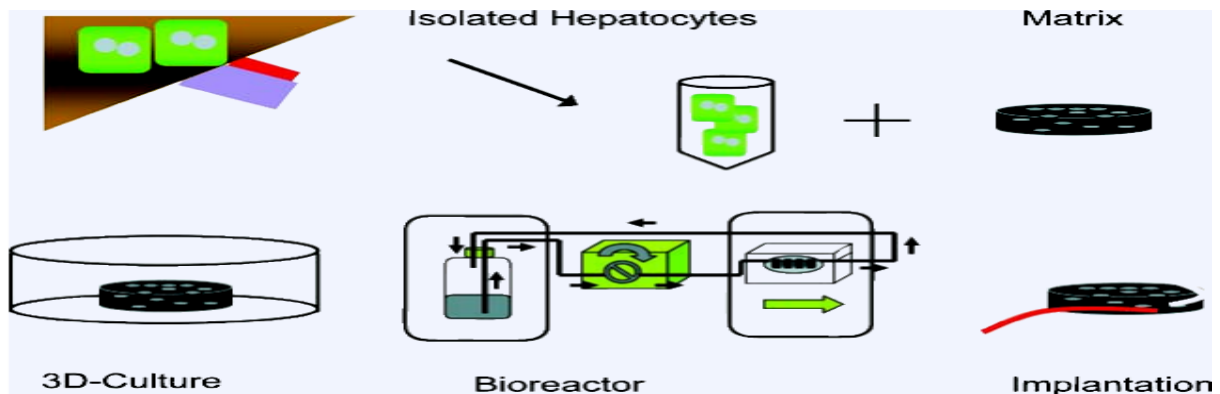


Fig. 7 - Representação esquemática da engenharia do tecido hepático. As células hepáticas isoladas sementeadas numa matriz tridimensional para estimulação da proliferação e diferenciação específica do hepatócito. Estas matrizes podem ser usadas para cultura tridimensional, cultura em sistemas de bioreactores e para transplante.⁸

A engenharia de um tecido hepático implantável enfrenta vários obstáculos devidos à natureza altamente metabólica e variabilidade funcional do fígado. Estudos prévios exploraram opções como a encapsulação de agregados de hepatócitos, ligação a *microcarriers* e o uso de polímeros biodegradáveis. Em qualquer dos casos, os hepatócitos transplantados revelaram manter inicialmente as suas funcionalidades, embora a sua eficácia a longo prazo não tenha ainda sido demonstrada.¹⁹

Os suportes podem permitir a regeneração *in vivo* do tecido saudável remanescente e também a formação de tecido a partir de células implantadas, *in vitro* e *in vivo*. No entanto, para garantir as funções de matriz artificial, um suporte deve ser altamente

poroso, com uma arquitetura interconectada, para que várias células possam ser implantadas e com um aporte adequado de nutrientes. Os microporos permitem tanto a formação da vascularização, como o transporte dos produtos do metabolismo, o que é muito importante para a sobrevivência das células no seu interior. Assim, dimensão e forma do poro deve ser controlada e variar entre os 100-500 μm . O suporte deve ter uma porosidade óptima, com uma área de superfície adequada e alguma resistência mecânica. A biocompatibilidade e cinética de degradação do suporte é igualmente importante e depende do tecido regenerado. Os produtos da sua degradação não devem ser tóxicos. Desejavelmente, os suportes devem libertar factores de crescimento, genes e outros sinais, ao longo do tempo. Redes, fibras, sólidos porosos ou hidrogéis podem servir de suportes e devem ter uma geometria controlada.²⁰

Os materiais devem permitir os processos de desenvolvimento normais e morfogénese. **Poli- α -hidroxiácidos**, especialmente polímeros glicólicos e lácticos, têm sido muito usados como biomateriais para produção de suportes. Estudos revelaram que os **poliglicóis** e seus copolímeros degradam-se muito rapidamente quando usados como suportes, pois a sua força tensil diminui para metade ao fim de duas semanas enquanto que a degradação dos **poli-lácticos** é muito lenta, podendo levar anos a ser reabsorvidos.²¹ Ao contrário dos biomateriais naturais como o colagénio, ácido hialurónico e quitina, a maioria dos **poli- α -hidroxiácidos** degradam-se por hidrólise não enzimática. No entanto, a hidrofilia dos polímeros naturais leva a que gerem produtos de fraca resistência tensil, comparativamente aos polihidroxiácidos, o que leva à sua limitada utilização.

Tabela 1. Poli- α -hidróxiácidos, polímeros sintéticos bioreabsorvíveis.²¹

Polímero	Sigla	Fórmula	Tg (°C)	Tm (°C)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tempo de Degradação (meses) ^b
Poli(ácido glicólico)	PGA		35 - 40	225 - 230	8,4	6-12
Poli(L-ácido láctico)	PLLA		60 - 65	173 - 178	2,7	> 24
Poli(D,L-ácido láctico)	PDLLA		55 - 60	Amorfo	1,9	12 - 16
Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)	PLGA		45 - 50 ^a	Amorfo	2,0	1 - 2
Poli(ϵ -caprolactona)	PCL		(-65) (-60)	58-63	0,4	24 - 36

^a Valores para o copolímero 50/50, ^b Até a completa bioreabsorção, Tg = Temperatura de transição vítrea, Tm = fusão

3.8 Engenharia dos tecidos *in vitro*/ *in vivo*

Existem duas possíveis aplicações dos tecidos produzidos pela sementeira de células num suporte. Uma delas consiste em promover o crescimento das células num bioreactor, para reconstrução *in vitro* de um tecido com recurso à engenharia dos tecidos. A outra é proceder ao implante da construção no organismo para que um novo tecido se forme *in vivo*.

A engenharia de tecidos *in vitro* produz vários tecidos a partir de uma única fonte de célula. Esta abordagem, permite a produção em massa de tecidos que são fornecidos após encomenda. Neste caso, a fonte celular utilizada não é a de um doente, mas sim de um adulto normal ou crianças. Tendo em conta que se trata de uma fonte alogénica, a sua aplicação clínica deve estar limitada a casos especiais como doenças crónicas. Por outro lado, a engenharia de tecidos *in vivo*, serve

apenas a um determinado paciente, pelo que não é vista como uma grande oportunidade de negócios.²³

3.9 Sistemas de cultura

A cultura de células estaminais tem geralmente três objectivos: manter as suas propriedades de autorenovação, manter a capacidade de diferenciação, e criopreservação para manter as linhagens estabelecidas.

Vários sistemas de cultura de hepatócitos como **microesferas de hidrogel**, **suportes poliméricos macroporosos e fibras ocas**, foram desenvolvidos e mostraram garantir as funções específicas do fígado, como a secreção de albumina e capacidade destoxificação. No entanto, a **cultura de hepatócitos em fluxo**, permite a formação de tecido novo e elevada produção de albumina, o que poderá permitir a criação de tecido hepático bioartificial funcional para transplante .

Existem **bioreactores de monocamada, suportes para perfusão e suspensões de células**, mas também são utilizados os bioreactores **de fibras ocas**.

A tecnologia de **fibras ocas** que foi desenvolvida para diálise dos rins, é uma tecnologia simples para o fígado. As células são protegidas do stress por contacto e assim, é possível cultivar um grande numero de células num pequeno volume, graças a uma grande superfície de adesão.

Apesar dos hepatócitos revelarem uma boa estabilidade quando cultivados em **monocamada**, as células são expostas a um certo stress de contacto quando as culturas são perfundidas. Estas culturas também têm uma pequena superfície em

relação ao volume. Por outro lado, a facilidade no “scale-up” e os efeitos positivos da arquitectura tridimensional da cultura de células são algumas vantagens.

Num estudo realizado por Fiegel et al, os **suportes para perfusão** revelaram efeitos positivos na arquitectura tridimensional das células. No entanto, também se verificou o problema do stress devido ao contacto.

Culturas em suspensão revelaram fraca estabilidade celular apesar das facilidades no “scale-up” e boas trocas entre o plasma e os hepatócitos imobilizados.⁸

3.10 Potenciais aplicações clínicas da engenharia dos tecidos .

Regeneração do intestino delgado

O síndrome de mal absorção é um estado clínico que afecta tanto crianças como adultos e caracteriza-se por uma fraca absorção de nutrientes e consequente malnutrição após recessão massiva do intestino delgado.

Embora muitos doentes possam sobreviver por largos periodos de tempo graças aos progressos na nutrição parentérica, as complicações a esta associadas, nomeadamente a disfunção hepática, a insuficiência renal progressiva, a desmineralização óssea e nalguns casos a septicémia associada ao uso de catéteres, contribuem para a mortalidade de 5% destes doentes anualmente.

As dificuldades em controlar a rejeição e imunossupressão associadas ao transplante do intestino delgado, bem como a escassez de órgão, têm limitado a realização de transplantes nestes doentes, pelo que têm-se investigado como

alternativa, o transplante de células intestinais usando suportes poliméricos biodegradáveis para gerar um tecido novo.²⁴

Reconstrução de válvulas cardíacas

A doença cardíaca é a maior causa de morbidade e mortalidade a nível mundial.⁷ Embora uma simples cirurgia de substituição da válvula possa efectivamente melhorar a qualidade de vida dos doentes, os implantes têm algumas restrições. Mais uma vez, a escassez de doadores, o perigo de rejeição e infecção são alguns dos maiores problemas.

A resistência a infecções, viabilidade celular e durabilidade associada à ausência de trombogenicidade constituem algumas das vantagens de uma válvula cardíaca obtida pela engenharia dos tecidos.

Apesar dos resultados promissores dos ensaios pré-clínicos, a aplicação clínica de válvulas cardíacas não tem sido bem sucedida.²⁵

Regeneração de cartilagens e ossos

As doenças congénitas e os episódios traumáticos em populações jovens, bem como a osteoartrite nos idosos são as principais causas de degeneração óssea.²⁶

Para garantir as funcionalidades das articulações é muitas vezes necessário recorrer à utilização de próteses, tendo em conta a dor, rigidez e instabilidade articular associada a estes quadros.

Em certos casos, a capacidade de regeneração do tecido ósseo está comprometida. Por outro lado, a composição e natureza avascular das cartilagens confere-lhes uma fraca capacidade regenerativa. O transplante de tecido ósseo do próprio doente de uma parte do corpo para outra ou de tecido ósseo da mesma região do corpo de um dador apresentam sérias desvantagens. O risco de transmissão de doenças e complicações relacionadas com a forma são alguns exemplos.

Assim, o recurso à combinação de células e suportes a 3D para a regeneração tecidual tem-se revelado uma alternativa promissora para a restauração da funcionalidade osteo-articular.²⁶



Vacanti et al. produziram tecido cartilaginoso em forma de orelha humana, com recurso ao implante de condrócitos em polímeros sintéticos.²⁷

Fig.8 Imagem de um rato com orelha humana - tecido cartilaginoso obtido pela engenharia dos tecidos.²⁷

3.11 Ensaios Clínicos

Tabela 2. Ensaios clínicos relacionados com o transplante de hepatócitos.²⁸

Reference	Cause of liver disease	Type of transplanted hepatocytes	Number of hepatocytes transplanted	Route of transplantation
Mito et al. [8]	LC (n=9), CH (n=1)	Freshly isolated autologous hepatocytes	$1.7 \times 10^7 - 6.0 \times 10^8$	Intraportal
Habibullah et al. [7]	FHF (n=7)	Pooled blood group-matched human fetal hepatocytes	$6 \times 10^7/\text{kg}$	Intrasplenic
Grossman et al. [9], Raper et al. [61]	FH (n=5)	Hepatocytes transfected with human LDL receptor cDNA using retroviral vectors in vitro before transplantation	$1 \times 10^9 - 3 \times 10^9$	Intraperitoneal
Strom et al. [1, 4]	hAAT (n=1), LC (n=1), SE (n=1), FHF (n=3), OTC (n=1)	Hepatocytes cryopreserved for 1.5 weeks–8 months (n=5) or 48-h cultured hepatocytes (n=1)	$7.5 \times 10^6 - 1.7 \times 10^8$	Intraportal
Soriano et al. [5]	FHF (n=3)	Cryopreserved (duration was not described) hepatocytes	$4 \times 10^7 - 4 \times 10^9$	Intrasplenic
Bilir et al. [6, 41]	FHF (n=5), LC (n=3)	Hepatocytes cryopreserved for 1–8 months (n=5; NA n=3)	3×10^9 (1) NA (7)	Intraportal
Strom et al. [2]	FHF (n=7), LC (n=2), hAAT (n=1)	→	NA	Intraportal
Fox et al. [58]	CJ (n=1)	Freshly isolated hepatocytes	7.5×10^9	Intraportal
Fisher et al. [3]	FHF (n=1)	–	8.8×10^8	Intraportal

^a Hepatocyte transplantation clinical cases reviewed by Strom et al. but not previously been reported in the literature are shown

O primeiro estudo clínico relacionado com o transplante de hepatócitos por insuficiência hepática foi realizado por Mito et al.²⁸ e consistiu no transplante de hepatócitos autólogos em dez pacientes com cirrose hepática (LC) ou hepatite crónica. No entanto, a sobrevivência a longo prazo dos hepatócitos só se verificou num dos pacientes e este ensaio foi considerado clinicamente ineficaz.

Vários ensaios clínicos foram subsequentemente realizados para o tratamento da hepatite fulminante (FHF) com diferentes causas. Num estudo realizado por Bilir et al, cinco pacientes com hepatite fulminante e candidatos a transplante hepático, receberam hepatócitos por transplante e três deles sobreviveram por mais tempo do que o esperado de acordo com a experiência clínica. Apesar do transplante do órgão por inteiro ser a terapia aceite, a escassez de doadores levou a que estes ensaios fossem realizados com o objectivo de determinar por quanto tempo o transplante de

hepatócitos seria útil para garantir as funções hepáticas até que o transplante ortotópico pudesse ser realizado.

Habibullah et al., realizaram um estudo em que 50% dos pacientes recuperaram “espontaneamente” após o transplante de hepatócitos. Isto demonstra a importância deste procedimento durante a fase crítica de disfunção da hepatite fulminante, quer permitindo que o fígado tenha essa recuperação, quer como um sistema temporário até ao transplante do órgão por inteiro.

Apesar dos resultados positivos, a avaliação da eficácia clínica destes procedimentos deve ser cuidadosa pois os resultados clínicos na hepatite fulminante dependem da causa da doença hepática. Por outro lado, o número de pacientes envolvidos nestes estudos não se considera suficiente para concluir sobre a eficácia do mesmo. Assim, serão necessárias mais investigações clínicas para determinar a importância de determinados factores no transplante de hepatócitos em pacientes com insuficiência hepática, nomeadamente a massa crítica de hepatócitos, a via de transplante que permite a infusão de um maior número de células e o tempo limite para transplante dependendo da causa e gravidade da doença hepática.

4- CONCLUSÕES/ DISCUSSÃO:

Apesar dos progressos científicos, existem poucos exemplos de aplicações clínicas de neo-órgãos produzidos pela engenharia de tecidos, o que poderá ser explicado pelos problemas associados com o “scale-up” e a morte celular associada à implantação. O desafio está em conseguir uma combinação correcta de células, suportes e rede vascular que permitam o início de transplantes de neo-órgãos com sucesso.

Para serem efectivas, as **células** devem ser de fácil produção, poder ser expandidas *in vitro*, sobreviver à implantação não sendo reconhecidas como estranhas e funcionar normalmente sem se tornarem malignas.

No que respeita ao fígado, a funcionalidade e sobrevivência dos hepatócitos *in vitro* é sem dúvida um grande desafio, pelo que é fundamental desenvolver **fontes celulares** e condições de cultura apropriadas para o sucesso da engenharia do tecido hepático.

Futuros desenvolvimentos na área da engenharia de biomateriais podem fazer surgir melhores **suportes** que possam direccionar o crescimento celular, manter funções diferenciadas e desenvolver estruturas tecidulares altamente ordenadas a partir de células desorganizadas.

É indispensável a combinação de várias áreas científicas, para que futuros desenvolvimentos possam permitir a reparação de tecidos e órgãos *in vivo*.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. K. J. Moll . M. Moll. *Atlas de Anatomia. Lusociência*, 4ª edição
2. Widmayer Raff Strang. *Vander's human physiology. The mechanisms of body function*. Mac Grow Hill, 10th edition
3. Robert Winston. *Anatomia e Fisiologia do Corpo Humano*. Civilizações, 2008
4. Rod R. Seeley, Trent D. Stephens and Philip Tate. *Anatomy and physiology*. Mac Grow Hill, 8th edition
5. Stefania Lorenzini, Stefano Gitto, Elena Grandini, Pietro Andreone, Mauro Bernardi. *Stem cells for end stage liver disease: How far have we got?* World J Gastroenterol 2008 August 7; 14(29): 4593-4599
6. Wei Zhang, Xiao-Ping Chen, Wan-Guang Zhang, Feng Zhang, Shuai Xiang, Han-Hua Dong, Lei Zhang. *Hepatic non-parenchymal cells and extracellular matrix participate in oval cell-mediated liver regeneration*. World J Gastroenterol 2009 February 7; 15(5): 552-560
7. www.unosdatabase.gov
8. Fiegel HC, Kaufmann PM, Bruns H, Kluth D, Horch RE, Vacanti JP, Kneser U. *Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory*. J Cell Mol Med. 2008 Jan-Feb;12(1):56-66. Epub 2007 Nov 16.
9. Yuji Ishii, Ryota Saito, Hideki Marushima, Ryusuke Ito, Taro Sakamoto, Katsusuhiko Yanaga. *Hepatic reconstruction from porcine liver cells using a radial flow bioreactor*. World journal of gastroenterology 2008, may 7, 14(17).2740-2747

10. Metallo CM, Azarin SM, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. *Engineering tissue from human embryonic stem cells*. J Cell Mol Med. 2008 Jun;12(3):709-29
11. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. *Tissue engineering of blood vessel*. J Cell Mol Med. 2007 Sep-Oct;11(5):945-57
12. Gupta S, Malhi H, Gorla GR. *Yonsei. Re-Engineering the liver with natural biomaterials*. Med J.2000 Dec;41(6):814-24.
13. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. *Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease*. J Inherit Metab Dis. 2006 Apr-Jun;29(2-3):431-5
14. Kafmann PM, Sano K, Uyama S, Takeda T, Vacanti JP. *Heterotopic hepatocyte transplantation*. Transplante Proc. 1994;262240-2241.
15. Fernando Ulloa-Montoya, Catherine M. Verfaillie, Wei Shou Hu. *Culture Systems for pluripotent Stem Cells*. Journal of Bioscience and Bioengineering vol. 100, n° 1, 12-27. 2005
16. Philippe A Lysy, David Campard, Françoise Smets, Mustapha Najimi, Etienne M Sokal. *Stem cells for liver tissue repair: Current knowledge and Perspectives*. *World J Gastroenterol 2008 February 14; 14(6): 864-875*
17. Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS, Hu WS, Verfaillie CM, Kaufman DS. *Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells*. Stem Cells Dev. 2005 Dec;14(6):643-55
18. Wen Jie Zhang, Wei Liu, Lei Cui, Yilin Cao. *Tissue engineering of blood vessel*. J. Cell. Mol. Med. Vol 11, n° 5, 2007 pp. 945-957

19. Valerie Liu Tsang, Alice A. Chen, Lisa M. Cho, Kyle D. Jadin, Robert L. Sah, Solitaire DeLong, Jennifer L. West and Sangeeta N. Bhatia. *Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels*. The FASEB Journal
20. Pascale V. Guillot, Wei Cui, Nicholas M. Fisk, Dame Julia Polak. *Stem Cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering*. J. Cell. Mol. Vol 11, nº 5, 2007 pp. 935-944
21. Yoshito Ikada. *Challenges in tissue engineering*. J. R. Soc. Interface (2006). 3, 589-601
22. Samuel H. Barbanti, Cecília A.C. Zavaglia. *Polímeros bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos*. Polímeros:Ciência e Tecnologia, vol. 15, nº1, p.13-21, 2005
23. Jonathan Mansbridge. *Commercial considerations in tissue engineering*. J.Anat. (2006) 209, pp527-532
24. Shinichi Terada, Mitchio Sato, Alexander Sevy and Joseph Vacanti. *Tissue engineering in the 21st century*. YM Journal. vol. 41, nº6, p.685-691, 2000
25. Karen Mendelson and Frederich J. Schoen. *Heart Valve Tissue Engineering*. Annals of biomedical Engineering, vol. 34, nº12, PP. 1799-1819, 2006
26. Lorenzo Moroni, Doreen Hamann, Luca Paoluzzi, Jeroen Pieper, Joost R. de Wijn, Clemens A. van Blitterswijk. *Regenerating Articular Tissue by Converging Technologies*.
27. Charles A. Vacanti. *The history of tissue engineering*. J. Cell. Mol. Med. Vol 10, No 3, 2006 pp. 569-576

28. Kazuo Ohashi, Frank Park, Mark A. Kay. *Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application*. J Mol Med (2001) 79:617–630