



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **ENGENHARIA DOS TECIDOS E ÓRGÃOS - SUCESSOS E DESAFIOS**

Trabalho submetido por  
**Ana Catarina Moreira Branco**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Dra Evguenia Bekman**

**Outubro de 2014**



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora EvgueniaBekman pela orientação, disponibilidade, críticas e opiniões. Também pelo apoio e palavras de incentivo que deu ao longo de todo o processo de elaboração deste trabalho.

Aos professores desta tão honrosa casa, por todos os ensinamentos transmitidos e pelos conhecimentos que fui adquirindo, e que irei aplicar na minha vida profissional e pessoal.

À minha família, um grande obrigado por todo o apoio dado ao longo do meu decurso académico e da minha vida e por todos os ensinamentos transmitidos. Espero poder retribuir e compensar todo o carinho e dedicação que me dão, e que continuarei a ter.

Aos meus amigos, obrigado por terem estado presentes e disponíveis para ouvir todas as minhas histórias, conhecimentos conseguidos, por me felicitarem por todas as minhas conquistas e sucessos e por me consolarem e encorajarem nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas e amigos que fui adquirindo durante esta etapa da minha vida, pelo apoio, pelas brincadeiras, pelas ajudas e sobretudo por estarem presentes em tantos momentos.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

## **Resumo**

A engenharia dos tecidos e órgãos é um campo multidisciplinar que abrange áreas científicas distintas como a ciência da vida e princípios de engenharia para a construção de substitutos de tecidos e/ou órgãos que tenham sofrido algum tipo de lesão ou doença, de modo a promover a sua regeneração e reparação.

Uma ciência composta por três componentes principais: as células, a estrutura de suporte ou scaffold e biomoléculas ou factores de crescimento. A ponderação e escolha de cada um deles é determinante para o sucesso da construção após a implantação no local alvo. Existe uma grande panóplia de células, biomateriais, métodos de fabrico do scaffold e factores de crescimento que podem ser escolhidos de modo a obter o tecido pretendido que seja estruturalmente e funcionalmente adequado.

Muitos tecidos já foram obtidos, através da conjugação de diversas combinações. Tecidos e órgãos como a pele, a cartilagem, o osso, a bexiga e válvulas cardíacas têm vindo a ser criados em laboratório e aplicados em clínica, contudo alguns contratempos permanecem e condicionam a aplicação terapêutica destes tecidos de uma forma mais alargada. Apesar de todos os sucessos já conseguidos desde a criação desta estratégia alternativa aos métodos cirúrgicos convencionais, alguns desafios permanecem, de nota-se assim a necessidade de manter a troca de conhecimentos e cooperação entre as várias áreas abrangidas pela engenharia dos tecidos e órgãos.

**Palavras chave:** Engenharia, Tecidos, Sucessos, Desafios

## **Abstract**

Tissue and organ engineering is a multidisciplinary field that encompasses distinct scientific areas such as life science and engineering principles to the construction of replacements for tissues and/or organs that have suffered some kind of injury or illness, in order to promote its regeneration and repair.

This science is composed of three main components: cells, scaffold or support structure and biomolecules or growth promoters. The weighting and choice of each of them is crucial to the success of the construction after deployment in the target location. There is a large array of cells, biomaterials, methods of scaffold manufacture and growth factors that can be chosen to obtain the desired tissue that is structurally and functionally appropriate.

Many fabrics have already been obtained, through the blending of various combinations. Tissues and organs such as the skin, cartilage, bone, bladder and heart valves have been created in laboratory and applied in clinic, yet several unsolved questions still remain and thus hinder therapeutic application of these tissues in a broader form. Despite all the successes already achieved since the creation of this strategy as an alternative to conventional surgical methods, some challenges remain, noting the need to maintain the exchange of knowledge and cooperation among the various areas covered by the engineering of tissues and organs.

**Keywords:** Engineering, Tissues, Successes, Challenges

## Índice

Capítulo I – Introdução.....	11
1.1. Medicina regenerativa .....	12
1.2. Engenharia dos tecidos e órgãos - Conceito.....	13
1.3. História .....	13
1.4. Futuro .....	18
Capítulo II – Componentes base.....	19
2.1 - Células.....	19
2.2 - Estruturas de suporte ou scaffolds.....	23
2.3 – Biomoléculas -Factores de crescimento .....	29
Capítulo III – Sucessos .....	32
3.1. Pele .....	33
3.2. Cartilagem .....	35
3.3. Osso .....	38
3.4. Bexiga.....	41
3.5. Válvulas cardíacas .....	43
Capítulo IV – Desafios .....	48
4.1. Vascularização.....	48
4.2. Formação de órgãos e tecidos complexos .....	51
4.3. Translação para clínica- regulamentação .....	54
Capítulo V – Conclusão.....	56
Bibliografia.....	58
Anexos	

## Índice de imagens

<b>Figura 1.</b> Representação do Transplante de órgãos sólidos global registado em 2012 (Global Observatory on Donation and Transplantation, 2013).....	11
<b>Figura 2.</b> Classificação das estratégias da Medicina Regenerativa .....	12
<b>Figura 3.</b> Quadro “Cura de Justinian”, representação de transplante homólogo de um membro para tratamento de um soldado ferido (Meyer, 2009).....	14
<b>Figura 4.</b> Os três elementos fundamentais da engenharia dos tecidos (Adaptado de O’Brien, 2011).....	19
<b>Figura 5.</b> Microscopia electrónica de scaffolds de biomateriais naturais (A) estrutura de colagénio; (B) rede de fibrina; (C) hidrogel de ácido hialurónico; (D) hidrogel de péptidos (Adaptado de Patterson et al., 2010).....	25
<b>Figura 6.</b> Microscopia electrónica de scaffold poroso (A) de PLGA e (B) de PLA (Adaptado de X.Ma, 2004).....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema da estrutura da Pele (Adaptado de Metcalfe & Ferguson, 2007) ....	33
<b>Figura 8.</b> Estrutura da matriz extracelular da cartilagem articular (Schulz & Bader, 2007).....	36
<b>Figura 9.</b> Bexiga criada através de engenharia dos tecidos, scaffold de colagénio e PGA semeado com células autólogas do músculo liso pronto para ser implantado em doentes (Adaptado de Atala et al., 2006).....	43
<b>Figura 10.</b> Imagem das válvulas xenogénicas (A e B) e das válvulas autólogas (C) usadas nas abordagens tradicionais (Adaptado de Vesely, 2005) .....	44
<b>Figura11.</b> Construção de um tecido ou órgão complexo pelo método de descellularização e recellularização (Badylak et al., 2012) .....	52

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Alguns tecidos construídos por engenharia dos tecidos e órgãos desde a primeira tentativa até 2010 (Adaptado de Orlando et al., 2011) .....	17
<b>Tabela 2.</b> Factores de crescimento mais utilizados em engenharia dos tecidos (Adaptado de Lee, Silva, & Mooney, 2011).....	30
<b>Tabela 3.</b> Tipo de células do osso e as suas funções (Adaptado de Salgado et al., 2004) .....	38
<b>Tabela 4.</b> Substitutos de válvulas cardíacas, diferenças entre método convencional e engenharia dos tecidos (Adaptado de Mendelson & Schoen, 2006) .....	47
<b>Tabela 5.</b> Vantagens e desvantagens de cada estratégia de vascularização (Adaptado de Novosel et al., 2011).....	51

## Lista de abreviaturas

ADSCs– (do inglês, Adipose DerivedStemCells) Células estaminais derivadas do tecido adiposo

ASCs– (do inglês, AdultStemCells) Células estaminais adultas

ESCs– (do inglês, EmbryonicStemCells) Células estaminais embrionárias

ECs – (do inglês, EndothelialCells) Células endoteliais

iPSCs– (do inglês, inducedPluripotentStemCells) Células estaminais pluripotentes induzidas

MEC– Matriz extracelular

MSCs– (do inglês, MesenchymalStemCells) Células estaminais mesenquimais

PEG – Polietilenoglicol

PGA– (do inglês, Polyglycolicacid) Ácido poliglicólico

PLA– (do inglês, Polylacticacid) Ácido polilático

PLGA– (do inglês, Poly(lactic-co-glycolicacid) ) Ácido poli(lático-co-glicólico)

## **Glossário**

Alogénico – Quando o dador e o recipiente são pessoas diferentes

Autólogo–Quando o dador e o recipiente são a mesma pessoa

Biocompatibilidade –capacidade do material em realizar uma função específica com uma adequada resposta do hospedeiro

Bioreactor – Equipamento concebido para conter estruturas celulares e moleculares que são empregues num processo biológico específico e do qual os produtos resultantes do processo podem ser extraídos ou colectados

Biomoléculas –Péptido biologicamente activo proteína, carbohidrato, vitamina, lípido ou ácido nucleico produzido e purificados a partir de ocorrência natural ou organismos recombinantes

Blastocisto –Estadio embrionário pré-implantacional que consiste no botão embrionário rodeado de trofoblasto

Carrier–Transportador

Citoquinas –Biomolécula de sinalização intercelular

Diferenciação – Desenvolvimento para um fenótipo de célula mais especializado

Encapsulação – Procedimento através do qual materiais biológicos são colocados dentro de uma barreira semipermeável micro ou macroscópica

Ex vivo–Fora do Corpo

Feederlayer–Camada de células usada em cultura que tem o papel de apoiar o crescimento das outras células em cultura, providenciam substâncias auxiliares como substratos de adesão, nutrientes ou outros factores necessários para o crescimento em cultura

In vitro – Dentro de um ambiente artificial

In vivo–Dentro do corpo

Matriz extracelular – Matriz circundante das células, produzida pelas mesmas

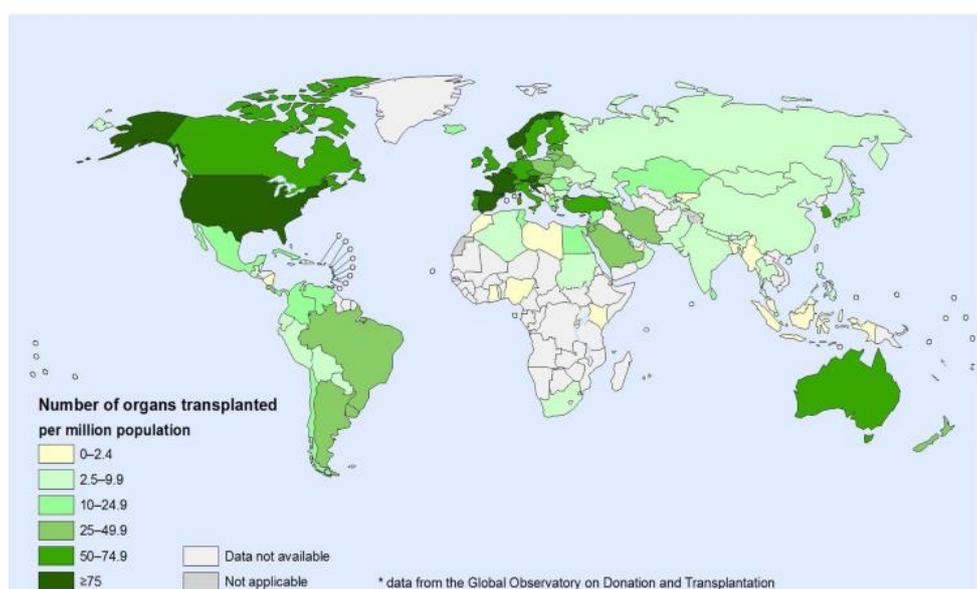
Proliferação – Aumento do número de células através da divisão celular

Scaffold – Estrutura de suporte, veículo de entrega ou matriz que facilita a ligação, a migração e o transporte de células ou agentes bioactivo

Xenogénico – Quando o dador é de uma espécie diferente do recipiente

## Capítulo I – Introdução

O transplante de órgãos é a terapêutica mais usada para o tratamento de falha irreversível de órgãos e tecidos. Segundo dados do Observatório Global de Doação e Transplantação no ano 2012 foram realizados 114 690 transplantes, o que representa menos de 10% das necessidades globais (Global Observatory on Donation and Transplantation, 2013). Esta medida terapêutica encontra-se condicionada pelo número de órgãos disponíveis para transplante, que é muito menor que a quantidade de doentes para os quais esta medida é a única alternativa (Nerem, 2008).



**Figura 1. Representação do Transplante de órgãos sólidos global registado em 2012 (Global Observatory on Donation and Transplantation, 2013)**

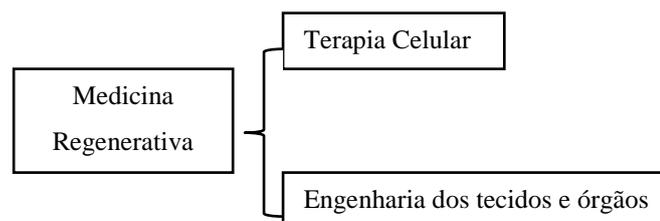
Tendo em conta todas as limitações que o transplante de órgãos exibe, desde o número limitado de órgãos disponíveis até a possível rejeição imunológica do órgão transplantado ou regimes terapêuticos de imunossupressão longos, surgiu a engenharia dos tecidos e órgãos (Bean & Tuan, 2013). A engenharia dos tecidos consiste numa vertente da medicina regenerativa que transforma a ideia da geração artificial de tecidos, órgãos ou de organismos vivos complexos em abordagens práticas para a introdução na medicina clínica (Meyer, 2009).

## 1.1. Medicina regenerativa

Foi apenas na década de noventa que o conceito de medicina regenerativa surge. Conceito que seria difícil de definir e que a grande maioria considerava o sinónimo de tecnologia das células estaminais em prólogo da regeneração e reformulação de um tecido ou órgão humano danificado. Contudo a medicina regenerativa é muito mais que apenas o uso de células estaminais, mas para haver uma definição mais concreta é necessário delimitar bem as principais abordagens que definem este campo da biomedicina (Meyer, 2009; Nerem, 2008).

A medicina regenerativa consiste no processo de substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos humanos com o objectivo de restaurar ou estabelecer o funcionamento normal (Culme-Seymour, 2012). A ideia base é a construção de tecido novo e funcional a partir de células vivas, por norma associadas a uma estrutura de suporte ou matriz que guia o desenvolvimento do tecido (J. Vacanti & Vacanti, 2007).

Na sua grande maioria as áreas de engenharia dos tecidos e medicina regenerativa são complementares. Podendo-se considerar que a engenharia dos tecidos providencia as ferramentas necessárias para a prática da medicina regenerativa (Badylak, Russell, & Santin, 2009).



**Figura 2. Classificação das estratégias da Medicina Regenerativa**

## 1.2. Engenharia dos tecidos e órgãos - Conceito

A definição de Engenharia dos tecidos e órgãos tem sofrido algumas alterações desde a sua criação até aos nossos dias. O nascimento deste termo foi feito apenas em 1987 durante a reunião da Fundação Nacional da Ciência, USA (Nerem, 2008). Começou a ser empregue em 1988 e foi definida por Skalak e Fox como “aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida de modo a compreender a relação entre estrutura-função em tecidos de mamíferos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos com capacidade de restaurar, manter ou melhorar as funções” (Chapekar, 2000), durante um congresso sobre o tema e onde foram premiados diversos trabalhos pioneiros nesta área (Nerem, 2008).

Com o desenvolvimento desta área da medicina e as diversas áreas científicas que foram sendo integradas levaram a Langer e Vacanti a definirem engenharia dos tecidos como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos com a capacidade de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido ou órgão” (Olson, Atala, & Yoo, 2011).

Uma definição simplificada foi introduzida e define a engenharia dos tecidos e órgãos como a combinação de células, engenharia, materiais e métodos de fabrico para obtenção de tecidos e órgãos vivos em ambiente *ex vivo* que possam ser implantados para melhorar ou substituir funções biológicas, como o uso de estruturas de suporte para a reparação ou regeneração do tecido (Culme-Seymour, 2012)

## 1.3. História

Desde a mitologia grega, geração de Prometheus, que o conceito da criação de vida a partir de espécies vivas ou não vivas sem o recurso a reprodução sexual tem vindo a ser falado. Também a história bíblica da criação de Adão e Eva se apoia nesta ideia (Meyer, 2009).

Podem ser observados muitos exemplos, desde livros e mesmo quadros que foram produzidos ao longo dos tempos. Muitas ideias e técnicas por eles descritas lembram as técnicas contemporâneas como a clonagem, a genética ou mesmo técnicas de células

estaminais usadas em engenharia dos tecidos e medicina regenerativa moderna. Diversos relatos de cura, regeneração e criação de partes do corpo foram sendo documentados(Meyer, 2009).



**Figura 3. Quadro “Cura de Justinian”, representação de transplante homólogo de um membro para tratamento de um soldado ferido(Meyer, 2009)**

A engenharia dos tecidos encontra-se ligada à evolução da medicina clínica e biologia. A construção e aplicação de próteses de várias partes do corpo, constituídas de diversos materiais diferentes, podem ser consideradas a primeira aplicação de biomateriais com o objectivo de reconstrução(J. Vacanti & Vacanti, 2007). Uma das primeiras destas tentativas foi a reconstrução dentária, diversas técnicas e abordagens foram documentadas, uma delas foi realizada por John Hunter que para além da aplicação da técnica criou uma base científica através de um trabalho experimental sobre o destino dos transplantes dentários homólogos em ratos(Meyer, 2009).

No século XVI surgiu o conceito de substituição de um tecido por outro, nesta altura foi descrita por Tagliacozzi de Bolonha a substituição do nariz por um construído a partir de uma porção do braço (J. Vacanti & Vacanti, 2007). Contudo o maior marco foi a primeira utilização de enxertos de pele, no século XIX, diversas experiências foram feitas. O primeiro transplante cutâneo autólogo com sucesso foi realizado por Heinrich Christian Bünger, após isto novas tentativas e abordagens foram desenhadas(Meyer, 2009). Com estes avanços foi possível a introdução de técnicas de restauração da função de um tecido através da substituição estrutural, transplante(J. Vacanti & Vacanti, 2007). Conhecimentos sobre os mecanismos inerentes aos transplantes permitiram perceber como funciona a regeneração dos tecidos, processo que se baseia na proliferação

celular. Estas descobertas permitiram o desenvolvimento de investigações sobre a cultura de células fora do corpo. Os grandes avanços que foram sendo feitos à volta desta ideia de cultura de células tornaram a biologia celular a linha base da engenharia dos tecidos(Meyer, 2009).

Trabalhos desenvolvidos por AlexisCarrel, o fundador do transplante de órgãos moderno e vencedor do Prémio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1912, sobre a anastomose vascular são considerados os primeiros da era do transplante de órgãos moderna. Através do desenvolvimento destes conhecimentos e técnicas tornou-se possível o transplante de órgãos inteiros ou partes do corpo humano. Para além de estes trabalhos,desenvolveu juntamente com Charles Lindbergha bomba de perfusão o que permitiu manter os órgãos vivos fora do corpo durante o transplante, foi um passo importante no desenvolvimento de sistema de perfusão para cirurgia e para a construção dos bioreactores(Beau & Tuan, 2013; Orlando et al., 2011). Foi neste período, século XX, que surgiu um conceito mais concreto de transplantação, a capacidade de transplantar um órgão de um indivíduo para outro (Nerem, 2008).

Muitas cirurgias foram feitas e falharam, a primeira tentativa remonta a 1911 (Nerem, 2008), isso devido ao nível da compatibilidade imunológica, ou seja, havia o desencadeamento de uma resposta imunológica que levava à rejeição dos tecidos e órgãos transplantados. Foi então considerado que para haver sucesso na transplantação é necessário saber o estado imune do enxerto e do paciente(Beau & Tuan, 2013; Meyer, 2009). Os primeiros trabalhos envolvidos na imunossupressão envolviam o uso de células adultas(Atala, 2014). A imunomodulação continua a ser um ponto crítico das aplicações de medicina regenerativa. O primeiro trabalho registado em que este ponto foi superado foi realizado por J.P. Murray em 1954, através do transplante alogénico entre gémeos idênticos. Só após o desenvolvimento de medicamentos imunossupressores, o transplante entre pessoas geneticamente diferentes foi possível(Meyer, 2009).

Mas o maior marco e mais conhecido da história de transplante de órgãos foi em 1967 quando foi realizado o primeiro transplante de coração, por Barnard na África do Sul, apenas possível graças aos avanços da biologia e imunologia (Fuchs, Nasser, & Vacanti, 2001).

O termo de engenharia dos tecidos surgiu apenas no início da década de 80 onde era aplicada quando se falava de manipulação de tecidos e órgãos ou mesmo na aplicação

de próteses e biomateriais, num nível ainda apenas literário. Uma definição mais concreta e que se assemelha com a que existe actualmente apenas foi introduzida em 1987. Foi nesta década que os grandes pioneiros desta área surgiram, nomes como: Anthony Atala, Francois Auger, Stephen Badylak, Eugene Bell, Robert Langer, Gail Naughton, Julia Polak, Charles Vacanti, Joseph Vacanti e Ioannis Yannas (Meyer, 2009; Nerem, 2008).

No seu início a engenharia dos tecidos baseava-se apenas em abordagens de cultura de células e tecidos, foi através deste princípio que W. T. Green fez tentativas de gerar cartilagem, por meio da cultura de condrócitos em combinação com scaffold ósseo. Todavia tais experimentos não foram bem sucedidos, mas foi possível através deles estabelecer uma concepção teórica sobre a conexão das células com a estrutura de suporte (Meyer, 2009). Em 1982 foi descrito a regeneração parcial de pele de um modelo animal por meio de um scaffold semeado com células, experiência realizada pelo Professor Ioannis Yannas (Nerem, 2008). Já em 1991 a equipa de Charles Vacanti tratou um paciente com uma malformação congénita do esterno com um scaffold polimérico semeado com condrócitos (Badylak et al., 2009).

A cooperação entre Robert Langer e Joseph Vacanti resultou no desenvolvimento de uma nova tecnologia em engenharia dos tecidos, o que catapultou esta nova disciplina da biomedicina. O caso do rato com orelha humana nas costas em 1997, que consistiu em engenharia da cartilagem, saiu do ambiente laboratorial e foi divulgado a todo o mundo, despertando a atenção do público para a engenharia dos tecidos. Desde aí a engenharia dos tecidos foi considerada uma das mais promissoras tecnologias da biomedicina do século (Meyer, 2009).

Foi na década de noventa que houve explosão na investigação desta área da biomedicina, não apenas numa vertente académica mas também numa vertente comercial. Foi também nesta década se formou a Sociedade de Engenharia dos Tecidos, em 1995, e surgiram os grandes centros de pesquisa. Mas muitas expectativas, por vezes irrealistas, foram criadas envolta da potencialidade da engenharia dos tecidos (Nerem, 2008).

O resultado desta expansão da investigação traduziu-se na comercialização de alguns produtos, na sua maioria substitutos da pele. Um dos grandes sucessos de aplicabilidade de engenharia dos tecidos foi a utilização da submucosa acelular do intestino delgado em variados casos. Mas até estes, que chegaram ao mercado, tiveram alguns desafios, desde uma base científica insuficiente a atrasos na aprovação por autoridades

reguladoras. Todos estes percalços levaram a que o tempo desde a criação em laboratório à comercialização fosse muito longo. Devido ao atraso na comercialização dos produtos, pode-se considerar que a indústria de substitutos de tecidos e órgãos por meio de engenharia dos tecidos e órgãos ainda está a dar os primeiros passos, mas é muito promissora. Apesar de poucos produtos se encontrarem a ser empregues em clínica, a investigação desenvolvida ao longo dos anos noventa representou aquisição de novos conhecimentos que se traduzirá na construção de melhores substitutos no futuro (Nerem, 2008).

Foi também na década de noventa que a célula estaminal embrionária foi isolada pela primeira vez e as primeiras tentativas de clonagem foram feitas (Orlando et al., 2011). A descoberta destas células trouxe um novo alento à engenharia dos tecidos, significando uma nova fonte celular possível de ser empregue na construção de tecidos (J. Vacanti, 2010).

Desde este período que novas combinações entre células e scaffolds têm vindo a ser experimentadas, na tentativa da obtenção da construção mais similar com o tecido nativo.

**Tabela 1. Alguns tecidos construídos por engenharia dos tecidos e órgãos desde a primeira tentativa até 2010 (Adaptado de Orlando et al., 2011)**

<b>1981</b>	Primeiro produto de engenharia dos tecidos com células autólogas, pele
<b>1996</b>	Primeiro clone de um mamífero, ovelha Dolly
<b>1998</b>	Primeira descrição das células estaminais embrionárias humanas
<b>1999</b>	Primeiro transplante de engenharia de tecidos, bexiga
<b>2001</b>	Implantação de vasos sanguíneos construídos por bioengenharia
<b>2004</b>	Primeira uretra de bioengenharia
<b>2008</b>	Produção do primeiro órgão modular complexo (CMO) <i>ex vivo</i> inicialmente como coração de rato acelular Primeiro transplante de traqueia humana construída com células estaminais autólogas
<b>2010</b>	Construção de fígado e pulmão

#### 1.4. Futuro

Apesar de todos os contratempos e atrasos da aplicação da engenharia dos tecidos e órgãos como uma solução médica, continua muito promissora. A criação de modelos *in vitro* para o estudo da biologia; redução da necessidade de dadores de sangue através da possível expansão e derivação de células hematopoiéticas, a partir de células estaminais; pâncreas bioartificial funcional; válvulas cardíacas com a capacidade de crescerem ao mesmo ritmo que as necessidades do hospedeiro; e reparação e regeneração do sistema nervoso central são alguns dos objectivos futuros desta ciência. Contudo o objectivo preliminar é a construção de soluções médicas personalizadas. Novos conhecimentos sobre mecanismos biológicos, processos de fabrico reprodutíveis que possam ser aplicados em larga escala, assim como um bom sistema de controlo de qualidade e método de armazenamento são necessários. Para isso se realizar é importante a existência de uma boa colaboração entre investigadores, biólogos e médicos (Meyer, 2009; Nerem, 2008).

## Capítulo II – Componentes base

A engenharia dos tecidos e órgãos encontra-se assente em três pilares, que se tornam os elementos essenciais para a construção de qualquer tecido, são eles as células, a estrutura de suporte ou scaffolds e os factores de crescimento (Moreno-Borchart, 2004).

Têm sido conduzidas diversas experiências ao longo do tempo de modo a otimizar cada um dos componentes e de obter mais conhecimento sobre a influência de cada um deles no desenvolvimento de um tecido ou órgão e a influência que têm uns nos outros. Torna-se assim imprescindível falar de cada um deles para uma melhor compreensão da engenharia dos tecidos.

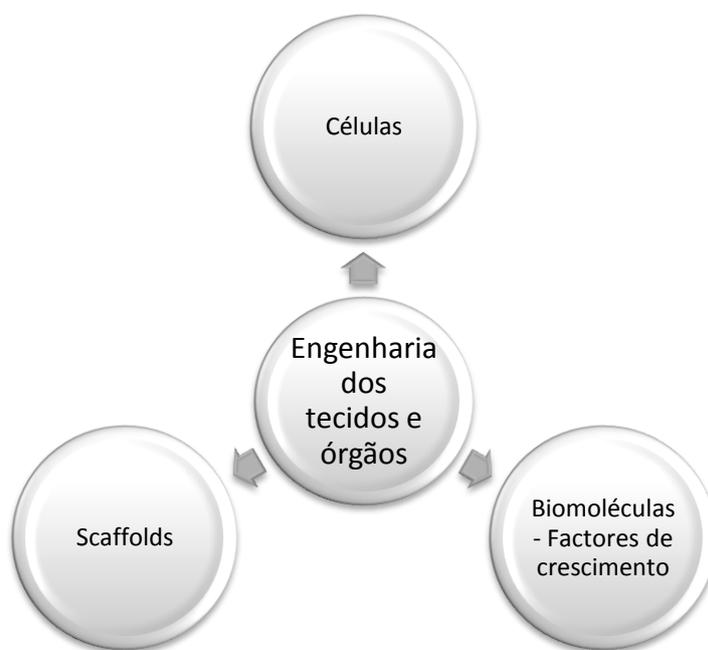


Figura 4. Os três elementos fundamentais da engenharia dos tecidos (Adaptado de O'Brien, 2011)

### 2.1 - Células

As células influenciam o sucesso da construção de tecido novo, é necessário gerar a quantidade suficiente para a construção de tecidos por meio da engenharia, tendo em conta que as mesmas devem conservar o fenótipo apropriado e serem capazes de cumprir normalmente as funções biológicas (Polak & Bishop, 2006).

Na escolha das células há que considerar alguns critérios, como por exemplo, o método de recolha/colheita deve ser pouco invasivo, produção de grande quantidade de células num curto espaço de tempo, as células devem apresentar alguma estabilidade durante o seu processamento *in vitro*, o protocolo de diferenciação deverá ser reprodutível (Dionigi & Fauza, 2012). Diferentes células podem ser utilizadas e a escolha do tipo dependerá do tecido a ser construído.

#### Células primárias

As células primárias são células específicas de um tecido que são colhidas por biopsia cirúrgica a partir do tecido em causa. Estas células são muito procuradas devido à compatibilidade imunológica que apresentam contudo são células regra geral muito diferenciadas e durante a permanência em meios de cultura podem expressar um fenótipo inapropriado. A taxa de proliferação destas células tende a ser baixa e a colheita de determinados tipos de células não é possível (Polak & Bishop, 2006). Apesar das desvantagens que apresentam, as células primárias autólogas continuam a ser utilizadas em engenharia dos tecidos no entanto algumas garantias devem ser asseguradas. Mais importante é a de que as células estejam totalmente livres de patógenos, por vezes existe a necessidade de suplementar o meio de cultura com produtos xenogénicos ou a presença dos mesmos pode ser um requisito para a proliferação celular, à que garantir então que estes produtos não estão contaminados (Dionigi & Fauza, 2012). Alguns exemplos de este tipo de células são os condrócitos; queratinócitos; fibroblastos; células endoteliais e células do músculo liso. De modo a ultrapassar as limitações que esta fonte ostenta novas fontes celulares têm vindo a ser estudadas.

#### Células estaminais

As células estaminais são descritas como células clonogénicas com a capacidade de se auto-renovarem e poderem gerar células-filhas especializadas por divisão celular assimétrica. Podem ser classificadas em totipotentes, células com a capacidade de se diferenciarem nas três camadas germinativas e em tecido extra-embriónico, pluripotentes, células que se podem diferenciar em todas as linhagens celulares, e multipotentes, estas células encontram-se limitadas a diferenciar em linhagens celulares específicas (Reinke, Dienelt, Blankenstein, Duda, & Geissler, 2014). Podem ser obtidas a partir de embriões, fetos ou de tecido adulto (Polak & Bishop, 2006).

As células estaminais embrionárias (ESCs) são extraídas de uma massa interior do blastocisto, chamado botão embrionário, obtido após a fertilização ou a transferência nuclear de uma célula somática para um ovo enucleado (Blum, 2014). As células estaminais embrionárias apresentam um grande potencial de aplicação em engenharia dos tecidos devido a duas propriedades, a aptidão de proliferarem infinitamente mantendo o estado pluripotente e a habilidade de se diferenciar em diversos tipos de células especializadas (Tuan, Boland, & Tuli, 2003).

Em 1998 foram derivados as primeiras ESCs humanas (Thomson, 1998). As células embrionárias humanas proliferam mais lentamente e exibem as colônias mais planas, quando comparadas com as ESCs murinas, no entanto a sua dissociação em células individuais é fácil (Polak & Bishop, 2006).

Para a cultura destas células em meios *in vitro* é necessário camadas alimentadoras (feederlayers) com o intuito de manutenção do estado pluripotente, o que se torna uma desvantagem pois a maioria das camadas usadas são de origem animal podendo assim haver a transmissão de patógenos. De modo a ultrapassar este obstáculo novos métodos e condições de cultura têm sido estudados (Polak & Bishop, 2006). Um outro uso destas células, está relacionado com a pluripotência que lhes é característica que pode provocar a formação de teratomas *in vivo* (Atala, 2007).

Devido à sua origem existem questões legais e éticas em termos do uso de células estaminais embrionárias humanas que têm de ser resolvidas para que seja possível a sua aplicação clínica (Atala, 2007). Outras fontes de células estaminais são assim investigadas.

O sangue fetal apresenta-se como uma fonte de células estaminais, particularmente de células estaminais hematopoiéticas e mesenquimais. Estas últimas podem ser propagadas em cultura e induzidas a diferenciar-se em diferentes tipos de linhagens celulares. No entanto, as células estaminais do sangue fetal, encontram-se em circulação sobretudo durante o primeiro trimestre, havendo assim uma janela de oportunidade reduzida e com alguns contras (Polak & Bishop, 2006).

Diversas fontes de células estaminais adultas têm sido descritas. Este tipo de células pode ser encontrado na medula óssea, no sangue periférico, no sangue do cordão umbilical, na placenta, no líquido amniótico, no tecido adiposo, no baço, na derme, no

folículo piloso, na membrana sinovial, no músculo-esquelético, no sistema nervoso central e no epitélio gastrointestinal (Dionigi & Fauza, 2012; Polak & Bishop, 2006). Desempenham um papel importante de manutenção e reparação dos tecidos onde se encontram (Polak & Bishop, 2006). Devido ao grande leque de fontes é possível obter tipos de células diferentes, mesenquimais, epiteliais, hematopoiéticas, neurais e endoteliais (Dionigi & Fauza, 2012).

Em termos gerais estas células podem ser isoladas do tecido de um doente, expandidas em cultura, incorporadas num scaffold específico para um tecido e implantadas no mesmo doente, uma vez que as células são autólogas não existe a necessidade de imunossupressão e o risco de rejeição (Polak & Bishop, 2006). O isolamento é realizado por meio de combinação de métodos, entre o uso de meios de cultura e métodos de isolamento directo, mecânicos, magnéticos ou imunológicos (Dionigi & Fauza, 2012).

As células mais usadas em engenharia dos tecidos são as células mesenquimais, pois apresentam um grande número de fontes, têm a capacidade de auto-renovação e possibilidade de diferenciar em diversas linhagens (Dionigi & Fauza, 2012). Além de secretarem um grande espectro de moléculas bioactivas com a capacidade de regular a resposta imunitária e conseguir organizar o ambiente regenerativo do tecido lesionado (Caplan, 2007).

A medula óssea é a fonte de células mesenquimais mais acessível, mais enriquecida e mais utilizada, é a partir dela que há a distribuição destas células para outros tecidos (Tuan et al., 2003). O tecido adiposo pode ser considerado uma fonte alternativa de células mesenquimais (Barrilleaux, Phinney, Prockop, & O'Connor, 2006).

Vantagens das células estaminais adultas como a compatibilidade imunológica, a fácil indução para linhagens celulares específicas e a disponibilidade, grande número de tecidos donde podem ser recolhidas, tornam estas células atractivas para a aplicação em engenharia dos tecidos (Barrilleaux et al., 2006).

#### Células estaminais pluripotentes induzidas

Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) são resultado de uma reprogramação genética para o estado pluripotente por transferência de quatro factores de transcrição Oct3/4, Sox 2, Klf 4 e cMyc (Lázaro, Yilmazer, & Kostarelos, 2014). Estas células assemelham-se assim as ESCs em termos transcricionais, epigenéticos e apresentam um cariótipo normal e a capacidade de diferenciar nas três camadas germinativas, a ectoderme, a endoderme e a mesoderme (Amabile & Meissner, 2009). As iPSCs podem

ser derivadas de qualquer célula adulta proliferativa, sendo os fibroblastos a fonte mais utilizada. O intuito da aplicação destas células em engenharia dos tecidos é a da geração de células iPSCsex vivo a partir de células somáticas do paciente, uma fonte autóloga, com posterior diferenciação em células do tecido afectado e transplantação, minimizando o risco de rejeição. Esta abordagem permite que sejam ultrapassadas certas limitações de outras fontes, por exemplo impedimentos legais e éticos no caso das ESCs. Contudo também estas células apresentam limitações ou entraves para a aplicação clínica, uma das que tem mais impacto é o processo de reprogramação, pela expressão dos factores de transcrição, que acarreta um risco de mutagénese, e pelos vectores usados. Outro entrave é que, a cultura destas células é feita por protocolos complexos e longos e os custos são ainda elevados (Lázaro et al., 2014)

## 2.2 - Estruturas de suporte ou scaffolds

Sob os scaffolds ou estruturas de suporte entende-se o biomaterial com estrutura tridimensional usado em engenharia dos tecidos antes da adição das células (O'Brien, 2011).

Um importante passo na formação de um novo tecido por meio da engenharia dos tecidos é a escolha e desenvolvimento do scaffold, que deve ser feito tendo em conta o local em que este será implantado (H. Chen et al., 2014). Ele irá ter um papel importante de suporte e irá funcionar como matriz extracelular artificial de modo a permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular ao longo do desenvolvimento do novo tecido (Chang et al., 2014) e conferir uma estrutura tridimensional e funcionalidade apropriada aos tecidos (Bártolo, Almeida, & Rezende, 2008), mesmo após a implantação.

Durante a construção do scaffold algumas condições devem ser preenchidas: a primeiramente a ver com biocompatibilidade, os materiais que constituem o suporte não devem desencadear nenhuma resposta inflamatória ou imunológica e não devem apresentar citotoxicidade (Mikos & Temenoff, 2000), tanto para as células que serão semeadas tanto para o tecido onde será implantado. Segundo, o scaffold tem de ser de preferência biodegradável, ou seja, à medida que as células vão proliferando e

produzindo a sua própria matriz extracelular o scaffold deverá ser substituído, os metabolitos resultantes da degradação deverão ser de fácil eliminação e não tóxicos; taxa de degradação controlada, à medida que o novo tecido for sendo formado o scaffold deverá ser degradado ao mesmo compasso, havendo assim a manutenção da organização tridimensional. Em terceiro lugar, devem ser tidas em conta as propriedades mecânicas (rigidez e flexibilidade, área de superfície), diferentes consoante o local em que for implantado, propriedades físicas que permitam a esterilização, a arquitectura e os biomateriais que os constituem (O'Brien, 2011).

Quando nos referimos à arquitectura falamos da macro e micro estrutura do scaffold, porosidade ou morfologia da superfície, tamanho dos poros, interligação dos poros, ou seja, características físicas do scaffold. Esta propriedade do scaffold tem influência na biocompatibilidade do suporte, na adesão, proliferação e diferenciação das células semeadas, e no desenvolvimento das funções biológicas do tecido (Chen et al., 2014). Os poros e a sua interligação permitem não só criar as condições nutricionais adequadas, de transporte de nutrientes e oxigénio e a eliminação de resíduos/metabolitos, como também possibilitam a migração e proliferação celular, a vascularização e a organização espacial adequada. Enquanto a porosidade confere estabilidade mecânica e tem influência no comportamento das células semeadas (Chen et al., 2014; Chua, 2001). Sendo assim esta característica tem que ser pensada e adaptada de modo a proporcionar as melhores condições possíveis para o objectivo pretendido.

Os biomateriais são definidos como materiais colocados em contacto com sistemas biológicos com o objectivo de avaliar, tratar, aumentar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do corpo (O'Brien, 2011). Tendo em conta o seu uso em engenharia dos tecidos e órgãos, na construção de scaffolds, devem se assemelhar à matriz extracelular, que irá funcionar como substituto até que as células sintetizem uma matriz natural nova, promovendo a adesão celular e disponibilizando factores de crescimento necessários para a proliferação celular (Patterson, Martino, & Hubbell, 2010).

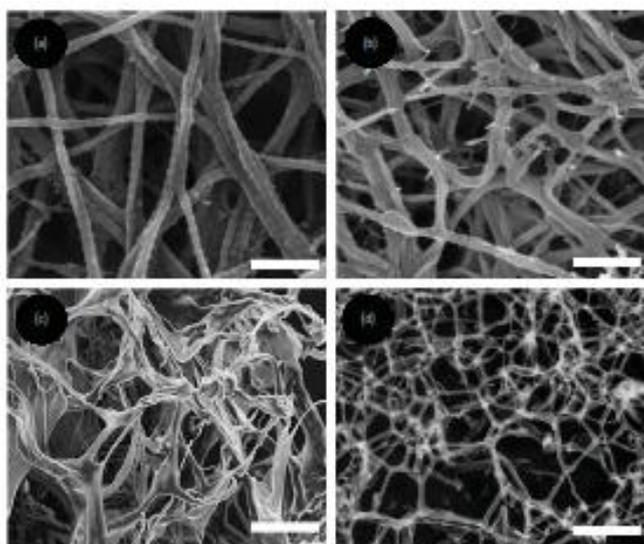
Os biomateriais encontram-se divididos em três grupos: derivados naturais, polímeros sintéticos e cerâmicas.

Diversos derivados naturais têm sido empregues na construção de scaffolds: colagénio, alginato, fibrina, quitina, quitosano, glicosaminoglicanos e matrizes descelularizadas (X.Ma, 2004; O'Brien, 2011).

O colagénio (proteína) é o componente mais abundante da matriz extracelular, pode ser obtido através da purificação de tecidos animais como a pele e os tendões ou de tecidos humanos que por norma são descartados, como a placenta (Patterson et al., 2010). As suas propriedades biológicas levam a que seja muito usado, contudo também apresenta algumas desvantagens em relação às suas propriedades mecânicas: tem uma fraca resistência mecânica e não permite uma boa manipulação, biodegradabilidade que não é facilmente controlável, e preocupações com possível transmissão de patógenos e imunogenicidade (Patterson et al., 2010; X.Ma, 2004).

A fibrina é proteína obtida a partir de fontes autólogas ou do precipitado do plasma humano. A matriz produzida com esta proteína exibe ser pouco activa para a maioria do tipo de células, para melhorar este parâmetro há a possibilidade de ser aditivada com factores de crescimento ou com fragmentos de matriz extracelular (MEC) (Patterson et al., 2010).

Os glicosaminoglicanos são polímeros lineares longos que têm como base repetições de bases de dissacarídeos presentes na MEC, um exemplo destes polímeros é o ácido hialurónico. Podem ser extraídos de tecidos animais por processos biotecnológicos ou de plantas.



**Figura 5. Microscopia electrónica de scaffolds de biomateriais naturais (A) estrutura de colagénio; (B) rede de fibrina; (C) hidrogel de ácido hialurónico; (D) hidrogel de péptidos (Adaptado de Patterson et al., 2010)**

As matrizes descelularizadas como a submucosa do intestino delgado, submucosa da bexiga, derme humana e válvulas cardíacas suínas, apesar de atractivas uma vez que já

nelas se encontram os constituintes naturais da matriz suscitam uma preocupação em termos da resposta imunitária que podem desencadear e da transmissão de agentes patogénicos quando provêm de fontes xenogénicas(X.Ma, 2004).

Os polímeros naturais apresentam vantagem ao nível da actividade biológica, na promoção da adesão e proliferação celular, e são biodegradáveis, condição importante a ter em conta na construção do scaffold(O'Brien, 2011). Contudo também exibem desvantagens: uma vez que se trataram de polímeros provenientes de fontes biológicas, a obtenção em grandes quantidades é um desafio(Mikos & Temenoff, 2000), por outro lado, eles apresentam uma grande variação entre diferentes lotes (Chua, 2001), fracas propriedades mecânicas (O'Brien, 2011)e podem desencadear uma resposta imunológica.

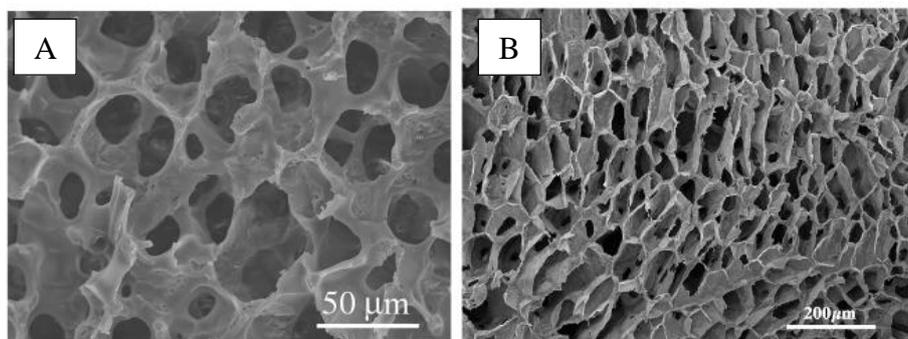
Os polímeros sintéticos permitem a adaptação da sua arquitectura e a sua degradação é possível de ser controlada (O'Brien, 2011). Para além do controlo possível destas características, ainda ostentam outras vantagens, possibilidade de uma produção em grande massa (Mikos & Temenoff, 2000) e devido à sua natureza o potencial de desencadear uma resposta imunológica e de haver a transmissão de agentes patogénicos é reduzido (Patterson et al., 2010).

A degradação destes polímeros é um parâmetro chave no seu desenho e aplicação em engenharia dos tecidos.Pretende-se que o material implantado seja substituído por tecido vivo sendo assim importante que a sua degradação seja controlada e dela não resultem produtos tóxicos (Patterson et al., 2010). Estes materiais são degradados por hidrólise e não por vias enzimáticas, o que permite que não haja variação da velocidade de doente para doente (Mikos & Temenoff, 2000).

Polímeros como poliésteres alifáticos lineares, polianidridos, copoliésteres, polifosfatos, polietilenoglicol (PEG), polivinilalcool, polimetacrilato, hidroxietilo e derivados do alginato são alguns exemplos.

Os materiais sintéticos mais usados na construção de scaffolds são os poliésteres alifáticos lineares, compostos como o ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) e o seu copolímero, ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). Cada um deles apresenta características que os tornam atractivos. O PGA é dos mais empregues devido à sua natureza hidrófila, o que permite uma degradação rápida quando colocado em meios aquosos ou *in vivo*. O PLA exhibe um grupo metilo extra em relação ao PGA,

isto torna-o mais hidrófobo traduzindo-se numa redução da velocidade de degradação. O PLGA apresenta uma degradação intermédia (X.Ma, 2004).



**Figura 6. Microscopia electrónica de scaffold poroso (A) de PLGA e (B) de PLA (Adaptado de X.Ma, 2004)**

As cerâmicas podem ser constituídas por hidroxiapatite, vidros bioactivos porosos e fosfato de cálcio (Chua, 2001). Este tipo de material é pouco utilizado de uma forma generalizada, já que determinadas características como o difícil processamento em estrutura porosas (X.Ma, 2004), a superfície dura e quebradiça que apresentam e o difícil controlo da velocidade de degradação (O'Brien, 2011) fazem-nas ser pouco atractivas. No entanto exibem propriedades mecânicas, como a rigidez e a baixa elasticidade, bastantes apreciadas como scaffolds de aplicação óssea(O'Brien, 2011).

Assim como existe uma grande variedade de materiais que podem ser usados na construção de scaffolds também diversos métodos de fabricação podem ser aplicados, métodos que permitem a manipulação das propriedades e arquitectura do scaffold.

A aplicação de técnicas têxteis permite a formação de fibras individuais de polímeros que são posteriormente moldadas em malhas tridimensionais. Os scaffolds resultantes deste método apresentam uma grande área de superfície de modo a promover uma boa adesão por parte das células posteriormente semeadas. Contudo também apresenta desvantagens ao nível da estabilidade estrutural (Chua, 2001).

Separação de fases é um método que tem em conta a instabilidade termodinâmica do sistema. Seja a separação de fase solido-líquido ou líquido-líquido o princípio é o mesmo, utilização de um solvente e uma mistura de polímeros e manipulação de temperaturas, aumento ou diminuição, sendo que o solvente é o responsável pela

morfologia dos poros. Esta técnica permite que posteriormente possam ser incorporados moléculas bioactivas à matriz (Chua, 2001; X.Ma, 2004).

Evaporação de solvente e lixiviação de partículas é uma técnica que se baseia na dispersão de partículas de solvente numa solução de polímero, sendo que esta mistura será posteriormente submetida a liofilização ou a evaporação de modo a eliminar o solvente da mistura. O solvente é o responsável pela configuração da arquitectura do scaffold, em termos do tamanho dos poros e da porosidade. Esta técnica apenas pode ser aplicada no fabrico de membranas pequenas e de fina espessura (Chua, 2001).

A maioria das técnicas mencionadas não permite um controlo total sobre o tamanho dos poros, a geometria e a distribuição dos mesmos assim como a interligação dos poros. Para além de desvantagens ao nível da estabilidade e arquitectura do scaffold, durante o processo de fabricação há o recurso de solventes orgânicos que podem ser tóxicos e não serem eliminados totalmente da estrutura o que poderá ter influência na adesão das células e na incorporação de sinais bioquímicos. Por outro lado estes processos de produção são longos e laborosos (Bártolo et al., 2008; Chua, 2001).

Outros métodos usados no fabrico de scaffolds são: a moldagem, uso de moldes e de microesferas de gelatina para a obtenção da forma e tamanho dos poros pretendidos; processamento a alta pressão, consiste na utilização de CO<sub>2</sub> a altas pressões seguida de indução de instabilidade termodinâmica; emoldes de hidrocarbonetos, processo com dois momentos, a lixiviação e a precipitação do polímero. Estes apresentam vantagens, desvantagens e particularidades. A porosidade obtida pela moldagem depende da proporção polímero/gelatina; no processamento a alta pressão não há o recurso de solventes, uma vantagem sobre a maioria dos processos no entanto a interligação dos poros não é conseguida; os moldes de hidrocarbonetos proporcionam um maior controlo na estrutura dos poros, porosidade e outras características estruturais (Chua, 2001).

De modo a ultrapassar as desvantagens dos métodos mais comuns novas técnicas têm vindo a ser desenvolvidas. A prototipagem rápida ou fabricação de forma livre, é uma nova técnica que tem como base a projecção e manufactura assistida por computador (X.Ma, 2004). Esta técnica permite a construção rápida de modelos tridimensionais complexos e a utilização de uma grande variedade de polímeros como matéria-prima. É possível construir scaffolds com uma estrutura exterior personalizada e uma morfologia interna predefinida, havendo assim controlo na microestrutura dos poros, no tamanho, na distribuição e na interligação dos poros. O processo inicia-se com

uma modelagem a computador com o recurso de técnicas de imagem, de seguida o modelo é cortado em camadas finas obtendo-se assim o scaffold final (Bártolo et al., 2008; Chua, 2002). Esta técnica permite assim que haja uma liberdade no desenho e fabricação do scaffold, tornando-se vantajosa.

### 2.3 – Biomoléculas - Factores de crescimento

Os factores de crescimento são moléculas biológicas, normalmente proteínas, capazes de se ligarem aos receptores da superfície das células desempenhando assim o papel de guia durante o seu desenvolvimento, nos processos de migração, proliferação e diferenciação celular (Chen, Zhang, & Wu, 2010).

**Tabela 2. Factores de crescimento mais utilizados em engenharia dos tecidos (Adaptado de Lee, Silva, & Mooney, 2011)**

Abreviatura	Tecido alvo	Funções
Ang-1	Vasos sanguíneos, coração, músculo	Maturação e estabilidade dos vasos
Ang-2	Vasos sanguíneos	Desestabilizar, redirecionar e dissociar células endoteliais de tecidos circundantes
FGF-2	Vasos sanguíneos, osso, pele, nervo, músculo, coluna vertebral	Migração, proliferação e sobrevivência de células endoteliais, inibição da diferenciação de células estaminais embrionárias
BMP-2	Osso, cartilagem	Diferenciação e migração de osteoblastos
BMP-7	Osso, cartilagem, rim	Diferenciação e migração de osteoblastos, o desenvolvimento renal
EGF	Pele, nervo	Regulação do crescimento celular e proliferação e diferenciação
EPO	Nervo, coluna vertebral, feridas	Promover a sobrevivência de glóbulos vermelhos e desenvolvimento de precursores de células vermelhas do sangue.
HGF	Osso, fígado, músculo	Proliferação, migração e diferenciação de células estaminais mesenquimais
IGF-1	Músculo, osso, cartilagem, fígado, pulmão, rim, nervo, pele	Proliferação celular e inibição da apoptose celular
NGF	Nervo, coluna vertebral, cérebro	Sobrevivência e proliferação das células neurais
PDGF-AB	Vasos sanguíneos, músculo, osso, cartilagem, pele	Desenvolvimento embrionário, proliferação, migração, crescimento de células endoteliais
TGF- $\alpha$	Cérebro, pele	Proliferação de células basais ou de células neurais
TGF- $\beta$	Osso, cartilagem	Proliferação e diferenciação das células formadoras do osso, factor anti-proliferativo das células epiteliais
VEGF	Vasos sanguíneos	Migração, proliferação e sobrevivência de células epiteliais

O fornecimento exógeno destas moléculas permite imitar o processo de reparação natural. Um passo importante é perceber as funções biológicas e o seu papel na matriz extracelular antes do desenvolvimento de estratégias de entrega. Os factores de crescimento agem a um nível mais local, devido ao curto alcance de difusão e ao facto de terem um tempo de meia-vida curto (Lee, Silva, & Mooney, 2011).

Diferentes factores tais como a natureza do factor de crescimento, a capacidade de difusão na matriz, o número de células alvo, o tipo de receptores e a transdução intracelular do sinal estão implicados na capacidade do factor de crescimento actuar numa subpopulação celular específica. A resposta celular ao mesmo factor de crescimento pode ser diferente entre as células. A resposta irá depender do tipo de receptor, o tipo de células e na transdução intracelular do factor (Lee et al., 2011).

Sabe-se que estas moléculas biológicas têm um papel importante no controlo das funções celulares básicas e também demonstram estar envolvidas nas actividades relacionadas com a regeneração tecidual, tendo a capacidade de incitar e orquestrar directamente a regeneração (Ji et al., 2011). Dependendo da habilidade do tecido em regenerar e a extensão da regeneração será necessário a integração dos factores de crescimento no processo (Chen et al., 2010).

O controlo do sistema de regulação dos factores de crescimento é fundamental, ao nível da sua distribuição temporal e espacial uma vez que o desencadeamento de certos processos celulares não depende somente da presença dos factores de crescimento. A técnica clássica de infusão de factores não permite que haja acção numa célula específica pode levar a uma resposta biológica inadequada, apresentando também desvantagens ao nível da estabilidade dos factores, a necessidade de grandes quantidades o que se traduz em custos elevados. Como o tempo de meia vida do factor é muito curto, tem-se vindo a desenvolver novas estratégias para melhorar o fornecimento de factores de crescimento, através da aplicação de sistemas de entrega com o uso de matrizes poliméricas, por meio de imobilização química ou de encapsulação do factor (método físico) (Lee et al., 2011).

Dois aspectos importantes têm de ser tidos em consideração no desenho do sistema de entrega: as moléculas incorporadas nas matrizes devem permanecer bioactivas, ou seja, a manutenção da estabilidade durante a fase de fabricação da matriz, a fase de armazenamento e a fase de degradação; e o perfil de libertação deve ser adequado à linha cronológica da regeneração tecidual (Ji et al., 2011). Para além dos requisitos

anteriores é fundamental ter bons conhecimentos sobre a distribuição *in vivo*, em termos quantitativos e qualitativos, dos factores de crescimento ao longo do processo de reparação e regeneração tecidual, do microambiente do local de acção e também a selecção do factor a utilizar (Chen et al., 2010).

Os novos métodos de entrega de factores de crescimento resguardam-nos de uma desnaturaçãoprematura, por métodos químicos e físicos, e permitem um controlo na libertação dos mesmos nos locais adequados e em concentrações apropriadas, através do controlo da taxa de degradação da matriz (Lee et al., 2011).

A imobilização química tem em conta a afinidade do factor-polímero e a afinidade factor-célula ou tecido. O método físico envolve a encapsulação, onde o factor de crescimento pode ser aprisionado dentro de um “carrier” ou associado ao polímero, com a difusão e a libertação programada do factor para o local de acção. A estrutura do polímero e as suas propriedades físicas vão influenciar a eficácia do mecanismo de entrega do factor, para além de terem também acção nos processos celulares (Lee et al., 2011). Uma das estratégias actuais consiste no uso de scaffolds com a forma exterior e a arquitectura interna específicas para o tecido a reparar com componentes bioactivos (factores de crescimento e outras biomoléculas) apropriados para a promoção da restauração funcional do tecido lesado (Chen et al., 2010).

A libertação dos factores de crescimento pode ser feita tendo como base a taxa de degradação da matriz, contudo por vezes o sistema de entrega necessita de responder a sinais ambientais locais de modo a libertar o factor. Os sinais ambientais podem ser mudança de pH, da temperatura, presença de enzimas ou de fármacos (Lee et al., 2011). Tendo como base este conhecimento é possível modificar ou ajustar as propriedades físicas e químicas do polímero que forma o sistema de entrega, de modo a que liberte o factor em determinadas condições garantindo que este actua no tempo e local certo, ou seja, alterar o perfil de entrega do factor de crescimento, mimetizando assim o processo natural de reparação (Chen et al., 2010).

Em resumo, a regeneração e reparação de tecidos depende da existência de factores de crescimento bem coordenados em termos temporais e espaciais. Assim para conseguirmos uma boa mimetização do processo de regeneração natural é importante terem bom controlo do material do sistema de entrega e da cinética de libertação do factor de crescimento, traduzindo-se em bons resultados na engenharia dos tecidos.

### Capítulo III – Sucessos

Doenças congénitas, cancro, infecções, inflamação, trauma, lesões iatrogénicas e outras condições a que o corpo humano está sujeito podem resultar em danos nos tecidos e órgãos. A engenharia dos tecidos e órgãos tem assim como objectivo a restauração da função dos tecidos e órgãos afectados (Atala, 2011).

A abordagem em que é usado um scaffold bioabsorvível é a mais aplicada na construção de diversos tecidos, como a pele, osso, bexiga e outros. O conceito consiste na integração de células, de determinado fenótipo, num scaffold poroso que é implantado no corpo, do qual se espera que seja gerado o tecido pretendido à medida que o scaffold é degenerado e eliminado (Vesely, 2005).

Durante a construção de qualquer tecido ou órgão é necessário haver conhecimento sobre a sua estrutura, composição e condições, em especial mecânicas, que lhe são inerentes de modo a obtermos uma construção o mais semelhante possível com o tecido nativo e que seja funcional. A construção de tecidos funcionais por engenharia dos tecidos e órgãos traduz-se na possibilidade de aplicação destes tecidos como medida terapêutica em contexto clínico.

O enxerto ideal deve ter em conta algumas características essenciais como estar prontamente disponível, ser de fácil manuseamento e colocação; deve ser aderente e ter as propriedades físicas e mecânicas adequadas; a sua degradação deve ser controlada; não deve desencadear resposta imune e provocar uma reactividade inflamatória mínima; deve ser estéril, não tóxico e não antigénico; deve ser capaz de cobrir e proteger o local onde é implantado, deve melhorar o processo de reparação natural, deve ser capaz de diminuir a dor e deve resultar num pequeno ou nenhum sinal de cicatriz (Groeber, Holeiter, Hampel, Hinderer, & Schenke-Layland, 2011; Metcalfe & Ferguson, 2007)

É importante perceber o que corre bem e as limitações de todas as tentativas feitas, assim como perceber as desvantagens das abordagens convencionais e tentar ultrapassá-las com a engenharia dos tecidos.

Tecidos como a pele, a cartilagem, osso, válvulas cardíacas e órgãos como a bexiga foram alguns dos sucessos desta abordagem.

### 3.1. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano que desempenha uma função de barreira física contra o ambiente externo, de regulação térmica e de manutenção da hidratação, torna-se assim importante para a sobrevivência. Trata-se de um órgão relativamente complexo em termos estruturais e funcionais. É constituída por 3 camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme, e diversas células com características e proveniências diferentes entre si. A epiderme tem a função de barreira e os queratinócitos, células que fazem parte desta camada, são responsáveis pela coesão estrutural da epiderme enquanto a derme confere as propriedades mecânicas à pele (Wong & Chang, 2009).

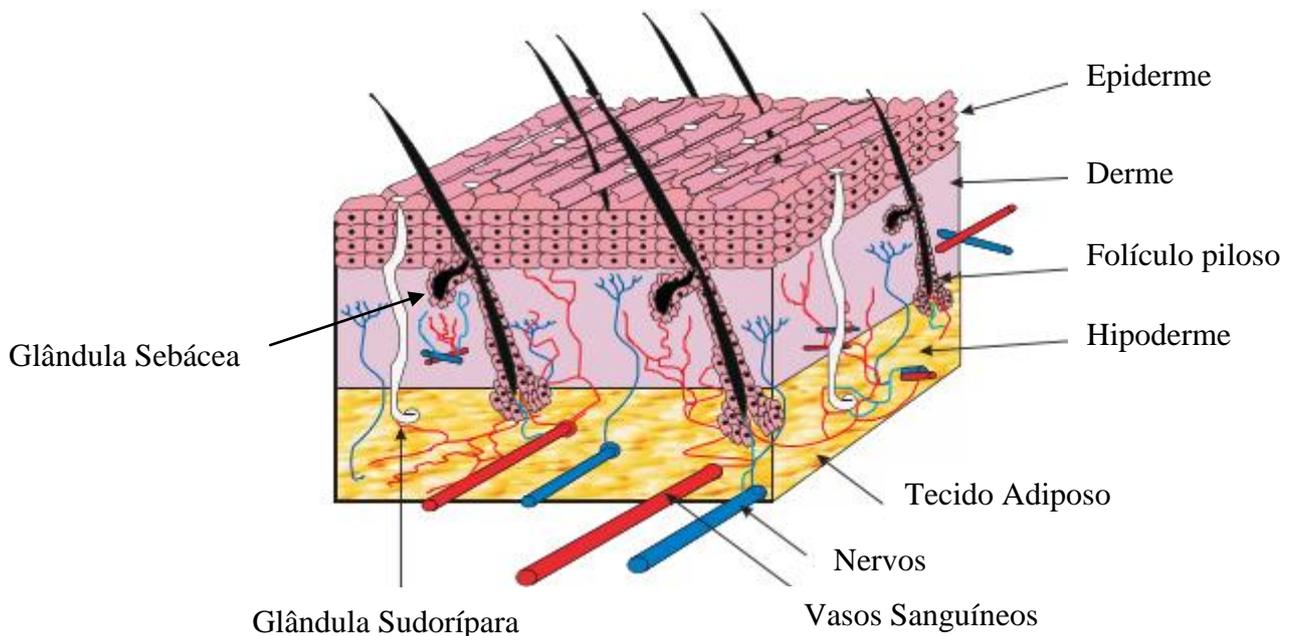


Figura 7. Esquema da estrutura da Pele (Adaptado de Metcalfe & Ferguson, 2007)

A pele possui a capacidade de reparação, no caso de algum dano, e encontra-se numa constante renovação. Estas capacidades devem-se à presença de células estaminais multipotentes e unipotentes, neste caso específicas da pele, que se encontram em 5 locais distintos, na camada basal da epiderme, no bulbo do folículo piloso, na base da glândula sebácea, na papila dérmica e na derme (Wong & Chang, 2009). Todo o processo de regeneração e reparação é estimulada e controlada por um número de moléculas biológicas, a sua má regulação pode conduzir a uma incorrecta reparação (Groeber et al., 2011). Apesar da capacidade de reparação que a pele exhibe, em certos casos como o de queimaduras extensas e de grande gravidade ou no caso de feridas

profundas nas quais são afectadas as diferentes camadas da pele, é necessário a construção e aplicação de enxertos.

A construção de pele através de engenharia dos tecidos que seja estruturalmente e funcionalmente equivalente com à pele normal é um desafio pois requer o conhecimento não só sobre a forma de obter células progenitoras da pele mas também um conhecimento da sinalização apropriada para a indução da morfologia correcta. A via de sinalização é complexa e envolve o controlo da auto-renovação, proliferação e diferenciação das células e tecidos, assim a manipulação da mesma permitirá a obtenção de tecidos diferenciados de modo adequado para a construção de substitutos pela engenharia dos tecidos(Wong & Chang, 2009).

As técnicas tradicionalmente usadas na reparação de grandes danos na pele, consistem na utilização de enxertos autólogos e alogénicos, apresentam desvantagens relevantes, ao nível da recolha do tecido, segurança e rejeição imunogénica no caso de enxertos alogénicos, que levou à procura de alternativas(Groeber et al., 2011). Os enxertos alogénicos são considerados uma medida de substituição temporária e que é usada há muito tempo e considerada a estratégia padrão, servindo de comparação para os outros métodos temporários como enxertos de fibroblastos e queratinócitos alogénicos neonatais numa matriz de colagénio(Shevchenko, James, & James, 2010).

A engenharia dos tecidos para substituição da pele apresentou-se como uma solução para algumas das desvantagens que o método tradicional exibia. A sua construção com células autólogas ou alogénicas sobre scaffolds naturais ou sintéticos, pretende mimetizar a arquitectura histológica da pele normal e iniciar e regular o processo de reparação(Groeber et al., 2011).

Algumas estratégias de construção têm vindo a ser testadas clinicamente e usadas no tratamento de lesões da pele. Diferentes enxertos construídos por engenharia dos tecidos estão disponíveis no mercado, a sua classificação depende da camada da pele que se pretende regenerar (anexo II). A construção tridimensional de esponja de colagénio semeada com fibroblastos e queratinócitos autólogos, permite o fecho da ferida e regeneração da pele. Esta construção é utilizada em casos de lesão da camada epidérmica e dérmica (Shevchenko et al., 2010). Uma técnica que tem vindo a ser estudada é a combinação de queratinócitos autólogos desagregados que são semeados numa matriz altamente porosa de colagénio e glicosaminoglicanos para a regeneração da epiderme e da derme *in vivo*(Metcalf & Ferguson, 2007).

A estratégia actualmente aplicada é o crescimento das células estaminais epidérmicas em matrizes de fibrina ou em derme alogénica. Isto confere vantagem ao nível da manipulação e manuseio do enxerto construído assim como ao nível da aceitação do mesmo após a implantação. Esta construção exhibe a capacidade de regenerar de forma normal a junção derme-epiderme e a porção superior da derme, caso seja necessário. Contudo, não têm a capacidade de restaurar totalmente a funcionalidade e propriedades mecânicas da pele(Wong & Chang, 2009).

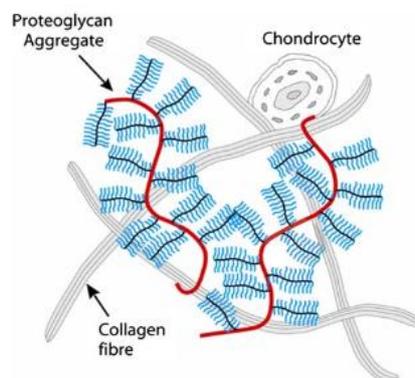
Os substitutos mais complexos disponíveis apenas têm na sua composição dois tipos de células, queratinócitos e fibroblastos, o que não permite a execução de todas as funções da pele, nomeadamente, a da termorregulação(Shevchenko et al., 2010).No futuro pretende-se incorporar nas construções não só substâncias que estimulem o crescimento celular mas também mais tipos de células, com o objectivo de construir substitutos que ofereçam uma regeneração completa, que se assemelhem o mais possível com a pele normal, em termos de composição e também de funções, e que permitam uma integração com o local de aplicação sem a formação de cicatriz(Groeber et al., 2011; Metcalfe & Ferguson, 2007).

### **3.2. Cartilagem**

A cartilagem é um tecido conjuntivo elástico e flexível aderente às superfícies articulares, não vascularizado e resistente à pressão, que desempenha funções de suporte, protecção e de ligação ou crescimento.

Existem três grandes tipos de cartilagem que podem ser encontrados no corpo, são distintos em termos da sua composição bioquímica e a estrutura da MEC (matriz extracelular) assim como a propriedades mecânicas que detém. Temos a cartilagem amarela elástica, esta cartilagem é formada por uma baixa concentração de células assim como de proteoglicanos, componente da MEC, mas apresenta uma elevada concentração de elastina. Estas características tornam-na pouco vulnerável a mudanças degenerativas, um exemplo deste tipo é a cartilagem auricular. Um outro tipo é a fibrocartilagem, composta por uma MEC pobre em proteoglicanos e elastina, um exemplo deste tipo é o menisco e os discos intervertebrais. Esta cartilagem exhibe uma

boa resistência a forças de compressão e a tensões de tracção. Por fim temos a cartilagem hialina, é um tecido branco de superfície lisa, resistente à compressão e a forças de tracção, faz parte deste tipo a cartilagem articular (Schulz & Bader, 2007).



**Figura 8. Estrutura da matriz extracelular da cartilagem articular (Schulz & Bader, 2007)**

A cartilagem articular é um tecido conectivo crítico que se encontra sobre um elevado stress mecânico, tem assim uma estrutura singular constituída por condrócitos embutidos numa MEC, constituída na grande maioria por água (70%) e uma rede tridimensional de fibras de colagénio, proteoglicanos e glicoproteínas. Esta cartilagem cobre as superfícies articulares de contactos de ossos interligados (Schulz & Bader, 2007; Zhao, Jin, Cong, Liu, & Fu, 2013). Uma vez madura exibe uma baixa capacidade de reparação, em casos de trauma, desgaste ou outro tipo de lesões é então necessário realizar uma intervenção cirúrgica de modo a reparar a articulação (Moreira-Teixeira, Georgi, Leijten, Wu, & Karperien, 2011).

Diversos tratamentos podem ser realizados quando se observa uma lesão mais profunda da cartilagem, ao qual o mecanismo de reparação intrínseco não é capaz de solucionar completamente, trata-se de métodos cirúrgicos como a remoção total da cartilagem e colocação de uma prótese de fibras sintéticas (Schulz & Bader, 2007). O método de transplante de tecido ou células autólogas e alogénicas também é uma estratégia comum para a substituição e/ou reparação da cartilagem, contudo este apresenta inúmeras limitações e uma baixa eficácia (Zhao et al., 2013).

Outras técnicas abrangem técnicas cirúrgicas de estimulação da medula para a utilização do mecanismo de autoreparação, ou métodos como a perfuração do osso subcondral permitindo a migração das células progenitoras e assim a formação da matriz da cartilagem. Este último, é um método rápido e de baixo custo contudo não existe uma

regeneração completa deste tipo de cartilagem já que foi observado que há a indução da formação de cartilagem fibrosa, uma cartilagem com propriedades mecânicas inadequadas. Um outro método que utiliza o mecanismo de autoreparação é um processo de dois passos, inicialmente é recolhida uma amostra de cartilagem para isolamento de condrócitos, que serão expandidos *in vitro*, antes da reimplantação dos condrócitos a lesão é coberta com uma aba periosteal sob a qual é realizada a injeção dos condrócitos, este é um método moroso e também dispendioso contudo promove a formação de cartilagem hialina com uma boa funcionalidade. Esta última é considerada a primeira estratégia terapêutica de engenharia dos tecidos, baseadas no uso de células (Moreira-Teixeira et al., 2011).

De modo a superar as limitações dos métodos tradicionais tem-se feito avanços em engenharia dos tecidos, através da construção de scaffolds ou biomatrizes semeadas com condrócitos e no qual são incorporados factores de crescimento e outros componentes que após implantados no local alvo desempenham um papel na indução da proliferação e diferenciação das células *in situ* (Zhao et al., 2013). A maioria das construções consiste em matrizes de hidrogéis constituídos por fibras de colagénio e derivados de ácido hialurónico. Estruturas tridimensionais permitem a manutenção do fenótipo das células, semeadas com condrócitos, células que irão sintetizar a MEC semelhante à nativa e formar assim uma cartilagem nova. Esta estratégia leva ao aumento das propriedades morfológicas, bioquímicas e mecânicas da cartilagem formada, permite um bom manuseamento e uma recuperação curta. Mas também existem limitações. A disponibilidade de condrócitos, quantidade de tecido que se recolhe por biopsia para a obtenção e isolamento dos condrócitos é limitada sendo então necessário expansão em cultura antes de serem semeados no scaffold. Foi também verificado que a actividade mitótica e metabólica diminui (Schulz & Bader, 2007; Zhao et al., 2013).

A utilização de células mesenquimais da medula óssea tem vindo a ser estudada e aplicada na construção de cartilagem, uma vez que apresenta algumas vantagens em relação aos condrócitos. Elas fazem parte do mecanismo de autoreparação da cartilagem, têm a capacidade de se diferenciarem em distintas linhagens celulares incluindo os condrócitos mas esta diferenciação por vezes tem de ser induzida por factores de crescimento ou por estimulação física. Pretende-se assim combinar as MSCs com scaffolds, biomateriais de uso clínico que exibam boas características para

aplicação em engenharia dos tecidos, em culturas devidamente estimuladas em termos mecânicos e bem monitorizados em sistema de bioreactores (Schulz & Bader, 2007).

### 3.3. Osso

O corpo humano é formado por 206 ossos. Este tecido é um dos mais duros do corpo e é o maior constituinte do esqueleto humano, é um tecido muito vascularizado e dinâmico. Tem como função principal o suporte estrutural do organismo, no entanto desempenha outras funções como protecção dos órgãos vitais, reservatório de minerais como o cálcio, suporte da contracção muscular para execução de movimento e ainda nele está contida a medula óssea, local de formação das células hematopoiéticas (“The Merck Manual- Home edition,” n.d.).

O tecido ósseo é formado por duas partes distintas, a parte trabecular ou osso esponjoso, que se caracteriza por uma elevada porosidade e uma grande resistência a forças de compressão, e a parte cortical ou osso compacto, exhibe uma forma mais sólida e pouco porosa. É constituído por três tipos de células, os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos, elas são responsáveis pela produção, manutenção e reabsorção do tecido. A sua matriz é formada por um componente mineral, a hidroxiapatite, e componentes orgânicos, como colagénio, glicoproteínas, proteoglicanos, sialoproteínas e proteína GLA (Salgado, Coutinho, & Reis, 2004).

**Tabela 3. Tipo de células do osso e as suas funções (Adaptado de Salgado et al., 2004)**

Tipo célula	Características morfológicas	Função
Osteoblastos	Forma cúbica, polarizadas e localizadas na superfície do osso	Síntese e regulação da decomposição e mineralização da MEC do osso; responde a estímulos mecânicos
Osteócitos	Forma estrelada; possui menos organelos que o osteoblasto	Calcificação da matriz; homeostase do cálcio; sensores mecânicos do osso
Osteoclastos	Célula multinucleada; células polarizadas	Absorção óssea

O osso tem uma alta capacidade regenerativa sem formação de cicatriz e necessidade de intervenção cirúrgica, quando sofre pequenos traumas ou doença, e ainda a capacidade de mobilizar reservas minerais caso haja necessidade metabólica. (Salgado et al., 2004; Woodruff et al., 2012). A remodelação e reparação do osso no caso de grandes defeitos ósseos, como grandes fracturas, ressecções de tumor, doenças genéticas ou defeitos congénitos torna-se difícil ou mesmo impossível. O tratamento padrão para os casos de grandes defeitos é o enxerto ósseo autólogo, mas apresenta desvantagens como a morbidade do local dador, disponibilidade reduzida e a sua preparação é difícil. Outras medidas como enxertos alogénicos e uso de substitutos sintéticos, como metais e cerâmicas, apresentam também limitações na sua utilização (Chimutengwende-Gordon & S. Khan, 2012).

Devido a todas as limitações exibidas pelos métodos mais convencionais a engenharia de tecidos apresenta-se como uma estratégia alternativa válida e promissora (Meijer, Bruijn, Koole, & Blitterswijk, 2007). Existem algumas condições que têm de ser tidas em conta no planeamento da estratégia de engenharia de tecido ósseo, são elas o estado clínico, a idade, o sexo, existência de doenças crónicas e hábitos do doente, a forma anatómica do implante e o local de intervenção (Salgado et al., 2004).

As estratégias actuais baseiam-se no uso de scaffolds de estrutura tridimensional, que funcionam como veículos para células ou factores de crescimento, em combinação com células com capacidade osteogénica, sendo as células estaminais mesenquimais obtidas do aspirado da medula óssea as mais usadas (Meijer et al., 2007). Estas construções devem estimular e apoiar o início da formação do osso e o seu contínuo crescimento, assim como a remodelação e maturação (Woodruff et al., 2012).

As primeiras experiências envolviam a utilização de biocerâmicas como material de scaffold onde eram cultivadas MSCs e implantadas no local com grandes defeitos ósseos, em todas elas se verificou que passado algum tempo houve a formação de novo osso e uma boa integração do implante. Esta construção permite que factores do próprio doente produzam a matriz óssea (Meijer et al., 2007). Novos biomateriais têm vindo a ser aplicados uma vez que as cerâmicas não preenchem todos os requisitos de um bom biomaterial, como a biodegradabilidade (Salgado et al., 2004).

Combinações entre MSCs e scaffolds de polímeros biodegradáveis têm vindo a ser elaboradas e testadas. Não se pode descurar a importância da porosidade e a interligação dos poros destes scaffolds para o sucesso da formação de tecido ósseo. Uma destas abordagens é a combinação de MSCs com scaffolds de PLGA, que antes da sua

implantação são submetidos a condições de cultura osteogénicas de modo a influenciar a diferenciação celular para esta linhagem. Nestes casos, após a implantação observou-se formação de tecido ósseo (Salgado et al., 2004). A cultura de MSCs em scaffolds de hidroxiapatite tem também vindo a ser testadas (Meijer et al., 2007).

O uso de scaffolds de compósitos em combinação com células ou factores de crescimento têm a capacidade de promoverem a regeneração óssea. Scaffolds compostos por policaprolactona e fosfato tricálcico têm sido empregue em locais que apresentam grande trauma ósseo e foi verificado a ocorrência de remodelação e regeneração, assim como a formação de matriz mineralizada e maturação do tecido ao longo do tempo em que o scaffold é degradado, observando-se deste modo uma substituição progressiva do scaffold por novo osso. Resultado, uma regeneração estrutural e funcional (Woodruff et al., 2012).

Para além das MSCs outras células têm vindo a ser utilizadas na construção de tecidos, como as células multipotentes do perióstio. Uma construção de scaffold de biomaterial coral natural, semeado com células do perióstio foi usada na substituição de uma falange. Algum tempo depois da implantação no local alvo verificou-se que o implante encontrava-se bem incorporado com o tecido circundante, estava vascularizado e havia a formação de novo osso (C. A. Vacanti, Bonassar, Vacanti, & Shufflebarger, 2001).

Uma abordagem que não envolve a utilização de células mas sim factores de crescimento em scaffolds de policaprolactona e fosfato tricálcico tem vindo a ser estudada, com bons resultados observados. Tem como base o recrutamento e estimulação de células endógenas, no local lesado, por factores de crescimento relevantes para a regeneração óssea (Woodruff et al., 2012). Mantendo a ideia da utilização de factores de crescimento, a encapsulação com hidrogéis ou vesículas de materiais como PEG e a fibrina é uma abordagem muito comum, devido a exibirem uma fácil dispersão na matriz e a serem altamente controláveis (Salgado et al., 2004).

Apesar de diversas estratégias serem estudadas, poucas são aplicadas na prática clínica ou mesmo em estudos clínicos em humanos. A demora da aplicação deve-se à falha de alguns requisitos como o número suficiente de células com propriedades osteogénicas, scaffold apropriados, indução da diferenciação osteogénica pelo uso de factores ou biomoléculas e ainda fornecimento vascular suficiente. A superação destas falhas levará ao sucesso da construção e a uma aplicabilidade clínica (Meijer et al., 2007). Para além disso, a combinação de uma construção em que são empregues não só células (MSCs)

como também sistemas de factores de crescimento com um scaffold de estrutura tridimensional apresenta-se como uma estratégia mais promissora para a obtenção de uma regeneração óssea eficiente (Salgado et al., 2004).

### 3.4. Bexiga

A estratégia standart na reparação de danos na bexiga é a utilização de segmentos gastrointestinais, contudo esta abordagem apresenta complicações a diversos níveis o que motivou a pesquisa e desenvolvimento de alternativas com o recurso da engenharia dos tecidos (Atala, 2011). Em 1917 foi reportado a primeira aplicação de enxertos de tecido livre para substituição da bexiga (Mahfouz, Elsalmy, Corcos, & Fayed, 2013). Uma variedade de materiais, naturais e sintéticos, podem ser empregues na construção destes substitutos contudo muitos falharam devido a problemas de propriedade mecânicas, estruturais, funcionais ou biocompatibilidade. A bexiga exhibe algumas particularidades em termos das suas características elásticas e de permeabilidade do urotélio (Atala, Bauer, Soker, Yoo, & Retik, 2006).

Para a construção de bexiga por engenharia dos tecidos, o scaffold utilizado deve ser capaz de suportar a adesão e proliferação de diferentes células, como as células uroteliais e as células do músculo liso. Deve ter a capacidade de suportar as forças resultantes do enchimento e esvaziamento da bexiga e ainda as forças exercidas pela musculatura pélvica ao longo das actividades do dia-a-dia (Mahfouz et al., 2013).

Consoante o tecido/órgão a ser substituído será necessário diferentes conformações, no caso da construção de um substituto da uretra devemos ter uma forma tubular enquanto no caso da bexiga é necessário uma construção com a forma esférica oca. (Atala, 2011)

Diferentes tipos de biomateriais têm sido empregues na construção de substitutos, materiais naturais como o colagénio e o alginato, matrizes descelularizadas como a submucosa da bexiga ou a submucosa intestinal, e ainda polímeros sintéticos com o PGA, o PLA e o PLGA. Cada um apresenta vantagens e desvantagens para a aplicação de construção de enxertos para a bexiga (Mahfouz et al., 2013).

A maioria dos materiais sintéticos usados na tentativa de reconstrução da bexiga falhara devido a problemas estruturais, funcionais, mecânicos e de biocompatibilidade. A

estratégia de scaffolds compostos de material sintético e natural, o colagénio, tem vindo a ser desenvolvida, mostrando ter benefícios para a construção de órgãos compostos por múltiplas camadas celulares, como é o caso da bexiga. Matrizes da bexiga alogénicas descelerizadas têm sido usadas como scaffold, a remoção de todos os componentes celulares é feito por meios químicos e mecânicos(Atala, 2011).

Em termos das fontes celulares, o uso de células nativas ou primárias apresenta a vantagem de já estarem programadas para a diferenciação para um tecido específico, assim como podem ser recolhidas do órgão a ser tratado do próprio doente não havendo o problema de rejeição. A aplicação das células estaminais na construção de tecidos tem vindo a aumentar, contudo algumas fontes deste tipo células são candidatos mais atractivos em relação a outros. As células estaminais mesenquimais (MSCs) e as células estaminais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) exibem vantagens que as tornam atractivas, no caso das MSCs tem a capacidade de se diferenciarem directamente em células do músculo liso e ainda a capacidade regular um número de processos químicos. Enquanto as ADSCs são de fácil obtenção e têm a capacidade de se diferenciar em células do músculo liso e assim formar tecido funcional e contráctil(Mahfouz et al., 2013).

A construção de estruturas tridimensionais *in vitro* facilita a diferenciação final das células depois da implantação *in vivo* e minimiza a resposta inflamatória, evitando assim a contractura e encolhimento da matriz. Para além disso estudos evidenciam a diferença que existe entre o uso de matrizes semeadas com células autólogas e as sem células. A utilização de matrizes semeadas com células sofrem menor retracção, retendo assim as suas dimensões originais(Atala, 2011).

Várias estratégias têm sido propostas, uma que se destacou das restantes foi a que se baseou na construção de bexigas com células autólogas, células do músculo liso e uroteliais, expandidas *in vitro* e posteriormente semeadas num scaffold de colagénio ou num scaffold composto de PGA-Colagénio com estrutura tridimensional. Este estudo mostrou que um scaffold composto por PGA e colagénio é uma óptima abordagem para a construção da bexiga por engenharia dos tecidos, devido ao facto de um dos componentes manter a integridade do suporte estrutural e o outro ajudar no crescimento e sobrevivência das células. O objectivo era a melhoria das funções da bexiga e da incontinência assim como a diminuição da pressão intravesical de doentes com doenças congénitas, como extrofia da bexiga e mielomeningocele. Após a implantação foram notadas melhorias ao nível da incontinência urinária e manutenção da função da

bexiga.No seguimento de uma análise histológica verificou-se uma arquitectura em três camadas, urotélio, submucosa e muscular. Esta estratégia permitiu a percepção da utilidade médica da utilização de uma construção autóloga regenerativa e que as técnicas para gerar bexigas por técnica de engenharia dos tecidos são benéficas (Atala et al., 2006).



**Figura 9. Bexiga criada através de engenharia dos tecidos, scaffold de colagénio e PGA semeado com células autólogas do músculo liso pronto para ser implantado em doentes (Adaptado de Atala et al., 2006)**

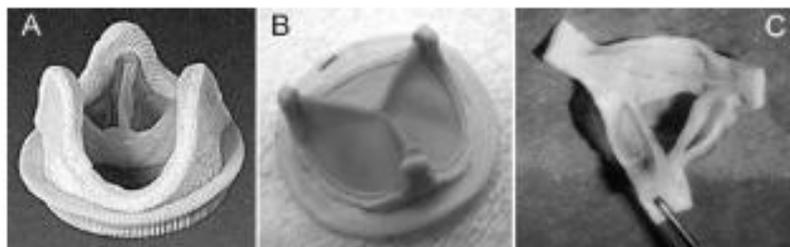
### 3.5. Válvulas cardíacas

O coração é um órgão de extrema importância no organismo, tem como função principal o bombeamento do sangue para todo o organismo proporcionando assim a chegada de oxigénio que os tecidos necessitam e a eliminação dos produtos resultantes desta respiração. É composto por músculo cardíaco, o miocárdio, e encontra-se separado por quatro cavidades (aurícula esquerda e direita, e os ventrículos esquerdo e direito). De modo a haver a separação entre cavidades do mesmo lado e separação das mesmas com os vasos, mais propriamente as artérias pulmonares e aorta que estão ligados respectivamente ao ventrículo direito e ao ventrículo esquerdo, existem as válvulas. A alteração dos componentes do coração, músculo e válvulas, traz grandes consequências para o bom funcionamento do mesmo e saúde do doente (“The Merck Manual- Home edition,” n.d.).

As válvulas cardíacas são tecidos dinâmicos, que são compostos por células especializadas e por uma matriz extracelular que é capaz de responder e se remodelar no caso de ocorrência de alterações das forças mecânicas do local. A sua principal função é

a manutenção do fluxo unidireccional do sangue, elas têm uma grande resistência a stress mecânico substancial e repetido e ainda a capacidade de reparação e adaptação no caso de algum dano(Mendelson & Schoen, 2006).O tecido das válvulas é formado por três camadas distintas em termos de localização e constituição, que são compostas por uma MEC fibrosa de colagénio, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos(Hinderer et al., 2014). São encontrados dois tipos de células, as células endoteliais e as células intersticiais(Mendelson & Schoen, 2006).

A abordagem actual para o tratamento de defeitos, doença ou mesmo trauma das válvulas cardíacas envolve uma substituição cirúrgica da válvula em causa, por próteses mecânicas ou por válvulas teciduais, categoria que inclui válvulas xenogénicas, alogénicas e autólogas(Cebotari et al., 2006). Apesar de esta terapêutica ter significado o aumento da sobrevivência e da qualidade de vida do doente, apresenta limitações como a necessidade de terapêutica anticoagulante no uso de válvulas mecânicas ou a calcificação e deterioração estrutural das válvulas xenogénicas e autólogas(Mendelson & Schoen, 2006). Uma outra desvantagem da estratégia tradicional é a sua incapacidade de se desenvolverem e remodelarem no caso de aplicação em doentes como as crianças, ou seja, não têm a capacidade de acompanharem o crescimento da normal do organismo (Cebotari et al., 2006).



**Figura 10. Imagem das válvulas xenogénicas (A e B) e das válvulas autólogas (C) usadas nas abordagens tradicionais (Adaptado de Vesely, 2005)**

Para uma construção de uma válvula cardíaca por engenharia dos tecidos com sucesso é necessário em primeiro lugar fazer uma análise dos componentes da estrutura complexa deste tecido e as suas interacções(Mendelson & Schoen, 2006). O objectivo desta estratégia é de gerar um substituto viável de uma válvula que seja composto por células saudáveis e com a capacidade de reparar danos na MEC, que se consiga adaptar a mudanças de condições ambientais e que consiga crescer à medida que seja necessário e a um ritmo adequado (Schoen, 2008).

A ideia base das estratégias de engenharia dos tecidos é a repopulação *in vivo* ou *in vitro* de scaffolds, usando células autólogas e factores de crescimento (Cebotari et al., 2006). Três estratégias foram desenhadas e estudadas, a primeira consiste na implantação de um scaffold de polímeros sintéticos biodegradáveis semeados com células cardíacas *in vitro*; a segunda estratégia é empregar um scaffold de tecido processado, ou seja, um tecido descelularizado ao qual são semeadas células cardíacas *in vitro* antes da sua implantação; e por último uma estratégia que envolve o uso das células endógenas do doente, consiste assim no repovoamento *in vivo* de um scaffold implantado através do recrutamento das células endógenas (Mendelson & Schoen, 2006).

Na primeira abordagem têm vindo a ser criados scaffolds sintéticos, com o uso de PGA, PLA ou PLGA como biomaterial, que são posteriormente semeados com células endoteliais vasculares. Os resultados foram muito positivos observando-se um crescimento de células na superfície do scaffold e a sua remodelação, mas apesar destes resultados as construções apresentavam algumas desvantagens em termos das suas características físicas como uma grande espessura, rigidez e pouca maleabilidade (Mendelson & Schoen, 2006; Vesely, 2005). De modo a contornar estas desvantagens foi fabricado um scaffold composto, com o recurso à utilização de PGA e de poli-4-hidroxiburato (P4HB). Esta composição tornou-o mais flexível. Esta construção, ao qual foram adicionadas células endoteliais vasculares e células do músculo liso, foi mantida em cultura num bioreactor por 14 dias e posteriormente implantada, algum tempo depois verificou-se que o scaffold teria sido substituído por tecido novo que exibia uma MEC semelhante com a do tecido nativo (Mendelson & Schoen, 2006). Uma outra composição testada foi o compósito de PLA e de PEG, neste caso mostrou-se uma base muito promissora devido ao facto de apresentar propriedades biomecânicas similares com o tecido nativo (Hinderer et al., 2014).

Ainda na trajetória da abordagem acima referida, de uso de scaffold semeado com células, têm vindo a ser usados scaffolds de materiais naturais, como submucosa do intestino delgado e o colagénio, como matriz. No entanto a matriz de submucosa do intestino delgado não aguenta as elevadas pressões a que as válvulas, em especial a aórtica, estão sujeitas (Vesely, 2005).

Uso das válvulas descelularizadas como materiais de scaffold, válvulas de origem xenogénica ou alogénica, semeadas posteriormente com células autólogas exibiram reconstrução da superfície e ainda a síntese de matriz (Mendelson & Schoen, 2006). Elas

têm vindo a ser empregues devido a sua propriedade biomecânicas, contudo têm desvantagens que tem de ser ponderadas aquando a sua aplicação. As válvulas xenogénicas desencadeiam uma resposta inflamatória da qual pode resultar uma cicatriz e o enfraquecimento da válvula o que a torna mais susceptível a danos ou mesmo rejeição. Este facto, deve-se principalmente às proteínas da MEC, uma vez que as válvulas alogénicas mesmo após um longo período de função não apresentam remodelação, crescimento e mesmo recelularização, ou pode se dever ao processo de descclularização uma vez que o mesmo pode alterar propriedades físicas da válvula(Cebotari et al., 2006; Mendelson & Schoen, 2006). Apesar da falha da recelularização das válvulas alogénicas, estas desempenham a função mecânica a que estão destinadas sem a necessidade de qualquer tipo de reforço adicional (Vesely, 2005).

Uma abordagem alternativa é a aplicação de um scaffold sem células mas que exiba um potencial para recrutar células endógenas, endoteliais e outras células. Sabe-se que as células precursoras endoteliais têm a capacidade de promover a regeneração do tecido através de estímulos como factores de crescimento, tendo em conta esta capacidade a aplicação de scaffolds revestidos com factores de crescimento apropriados para a promoção da adesão, proliferação e diferenciação das células precursoras endoteliais tem sido testada. Têm-se observado bons resultados com esta estratégia, com a substituição do scaffold por MEC semelhante ao tecido nativo, celularização e regeneração do tecido. Uma das limitações desta alternativa é o tamanho da lesão, em grandes lesões apresenta uma menor eficiência(Mendelson & Schoen, 2006; Schoen, 2008).

**Tabela 4. Substitutos de válvulas cardíacas, diferenças entre método convencional e engenharia dos tecidos (Adaptado de Mendelson & Schoen, 2006)**

<b>Características</b>	<b>Convencional (próteses mecânicas e biológicas)</b>	<b>Engenharia dos tecidos</b>
Encerramento do folheto	Rápido e completo	Rápido e completo
Tamanho do orifício	Menor que o das válvulas naturais	Melhor
Propriedades mecânicas	Estável	Estável
Inserção cirúrgica	Fácil e permanente	Fácil e permanente
Risco de trombo-embolismo	Sim, em particular com as válvulas mecânicas	Não
Risco de disfunção estrutural	Caso de degradação e calcificação no caso de válvulas biológicas	Resistente a calcificação e degradação
Risco de infecção	Sim	Não
Viabilidade	Não	Sim, tem a capacidade de reparar, remodelar e crescer

Muitos sucessos têm vindo a ser conseguidos ao longo do tempo e novos conhecimentos têm sido adquiridos com os tecidos construídos por engenharia dos tecidos, quer eles tenham tido sucesso ou tenham falhado. No entanto é importante salientar que poucas das construções obtidas e que se apresentaram bons resultados são realmente empregues na prática clínica, ou seja, a grande maioria dos sucessos obtidos resultaram de ensaios em modelos animais.

## Capítulo IV – Desafios

O progresso em biologia celular e da célula estaminal, ciência de biomateriais e da engenharia tem permitido o desenvolvimento de estratégias e tecnologias para a construção de tecidos. Mas apesar dos grandes progressos que já foram feitos ainda muitos problemas ou desafios estão por superar (F.-M. Chen, Zhao, Jin, & Shi, 2012).

Desafios como vascularização dos tecidos, a construção de tecidos e órgãos complexos, a translação para a clínica das construções e ainda a regulamentação desta área, ainda permanecem.

### 4.1. Vascularização

A vascularização é uma das limitações principais do sucesso das construções de engenharia dos tecidos, ela condiciona não só o tamanho como também a integração do tecido construído no local *in vivo*. A grande maioria dos tecidos necessita que esta rede, responsável pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio e a eliminação de metabólitos e outros componentes desnecessários, se encontre a uma distância curta *in vivo*, cerca 200µm, para que seja possível a difusão destes elementos. Apenas alguns tecidos têm a capacidade de serem fornecidos por vasos mais distantes, fazem parte destes tecidos a pele, a cartilagem e a córnea (Novosel, Kleinans, & Kluger, 2011).

Durante a construção do tecido os nutrientes podem ser fornecidos através da permanência da cultura em bioreactores, mas após a implantação isso não é possível contando apenas com a capacidade de vascularização dos tecidos hospedeiros circundantes, contudo este é um processo muito lento o que pode significar numa diminuição da funcionalidade e viabilidade do enxerto (Lovett, Ph, Lee, Edwards, & Kaplan, 2009; Rouwkema, Rivron, & van Blitterswijk, 2008). Sendo assim necessário a criação do sistema de vasos de modo a contornar a longa demora do processo. Existem muitas estratégias que podem ser empregues para a formação dos vasos, elas são organizadas segundo uma ideia base, a primeira tem como base as células endoteliais (ECs) e a sua capacidade de formar novos vasos, a segunda tem em conta a estrutura tubular dos vasos e consiste no uso de vasos de derivados biológicos ou o fabrico sintético de scaffolds tubulares (Novosel et al., 2011).

As células endoteliais permitem a formação de novos capilares a partir de vasos já existentes, esta capacidade permite que sejam empregues dois métodos diferentes para a obtenção de construções vascularizadas. Um dos métodos consiste na pré-vascularização *in vivo* ou *in vitro* do enxerto. A pré-vascularização *in vitro* consiste no uso de um scaffold ou tecido semeado com ECs no qual é gerado uma rede de capilares que será posteriormente implantado no local da lesão, enquanto a pré-vascularização *in vivo* é baseada na implantação de um tecido construído por engenharia dos tecidos no paciente, região com vasos adequados para ligação microcirúrgica como a cavidade peritoneal, onde será formada a rede de vasos, após a formação dos vasos remove-se a estrutura e os vasos formados, e o enxerto vascularizado é posteriormente implantado no paciente no local da lesão (Novosel et al., 2011; Rouwkema et al., 2008). Os métodos de pré-vascularização permitem a diminuição do tempo necessário para que ocorra a vascularização da construção após a implantação no local alvo, uma vez que apenas será necessário que os vasos do hospedeiro cresçam até as regiões limite do implante (Rouwkema et al., 2008). O outro método tem como base a indução da neoangiogênese *in vitro*, ou seja, a indução da formação de novos vasos através da adição ou entrega de factores de crescimento e citocinas promotoras da angiogênese, biomoléculas que terão um papel importante na activação, estimulação, migração e ainda organização das ECs de forma a promover a formação e maturação dos vasos (Novosel et al., 2011). Uma abordagem simples consiste na integração destas moléculas nos scaffolds ou na sua encapsulação com biomateriais (Lovett et al., 2009). A entrega em termos de espaço temporal e a dosagem destas biomoléculas tem de ser bem controlada pois uma má estimulação leva à formação de vasos desorganizados e fracos, o que significa uma má vascularização do tecido (Rouwkema et al., 2008). Esta indução pode também ser promovida através da imobilização de proteínas ou péptidos nos biomateriais aplicados em engenharia dos tecidos, moléculas que terão um papel na adesão e migração de ECs melhorando a angiogênese. Uma incorporação adequada de células, neste caso a integração de ECs no material da matriz, induz igualmente a formação de novos vasos (Novosel et al., 2011).

A segunda estratégia envolve o uso de scaffolds, podem ser empregues scaffolds de derivados biológicos ou scaffolds de biomaterial sintético. O scaffold biológico consiste em secções de tecido descelularizado onde a estrutura tridimensional da rede vascular é mantida, tecidos como a submucosa do intestino delgado é utilizada. Esta medida exhibe

uma biocompatibilidade e geometrias relevantes contudo também tem limitações como a falta de padronização e de reprodutibilidade (Novosel et al., 2011). Os scaffolds sintéticos para além de providenciarem uma superfície apropriada para a adesão celular devem também promover a vascularização, sendo assim necessário a concepção de estruturas tridimensionais adequadas nas quais temos de ter em conta os biomateriais com que vão ser construídas, as suas características e propriedades, e as técnicas de fabrico. Características como a porosidade e a interligação dos poros condicionam a vascularização e a velocidade a que esta ocorre. Este método permite a construção de scaffolds de uma maneira reprodutível, controlada e padronizada (Novosel et al., 2011; Rouwkema et al., 2008).

Inúmeras abordagens estão a ser ponderadas e estudadas para solucionar este problema, mas apesar dos avanços já feitos a construção de um modo reprodutível de tecido vascularizado ainda não foi alcançado, para que tal aconteça a junção das duas estratégias já usadas é essencial para se conseguir assim um sucesso na geração de tecido e órgãos pela engenharia dos tecidos.

**Tabela 5. Vantagens e desvantagens de cada estratégia de vascularização (Adaptado de Novosel et al., 2011)**

**Estratégia Baseadas em Células**

Pré-vascularização	√ Anastomose funcional com os vasos do hospedeiro
	√ Não é necessário a extensão da rede vascular do hospedeiro
	Necessidade de microcirurgias de perfusão
	Crescimento muito lento de novos vasos
Indução <i>in vitro</i> da neoangiogénese	√ Indução por factores de crescimento
	√ Iniciação da vascularização derivados de hospedeiro
	Pouco controlável
	Factores de crescimento instáveis
	Necessário técnicas avançadas de co-cultura de células

### Estratégia baseada em Scaffolds

Scaffolds biológicos	√ Material biocompatível
	√ Geometria relevante
	Padronização difícil Difícil reprodutibilidade Preocupações éticas em relação a fontes animais
Scaffolds sintéticos	√ Materiais e técnicas de fabrico variadas
	√ Concepção múltipla, reprodutível, padronizado
	√ Grande volume de produção
	Geometrias complexas, dimensões pequenas e propriedades mecânicas Necessidade de biofuncionalidade

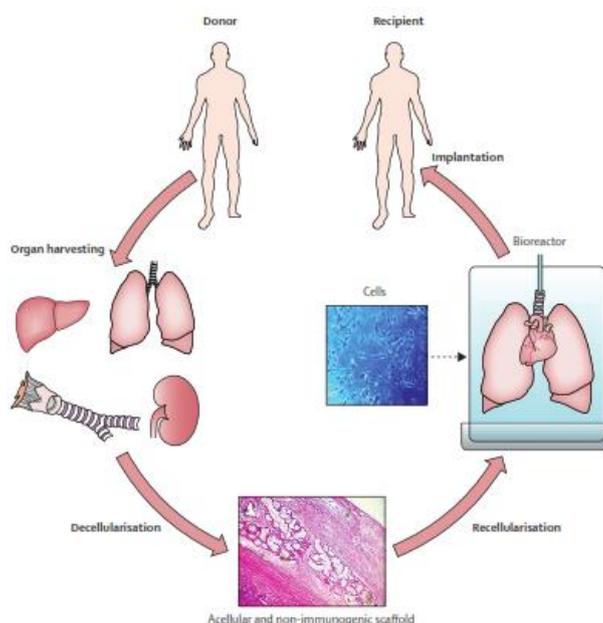
## 4.2. Formação de órgãos e tecidos complexos

Os órgãos e a maioria dos tecidos não é constituído apenas por uma camada simples de células e por um tipo de células, são estruturas compostas por diferentes camadas e diferentes tipos de células que se interrelacionam de modo a manter uma boa funcionalidade e estrutura (F.-M. Chen et al., 2012). Torna-se assim um desafio a construção de órgãos complexos como o coração ou o fígado. Este também é o maior objectivo da engenharia dos tecidos e órgãos. Mas para isso é necessário ter um bom conhecimento sobre o gradiente composicional do tecido, as células que condicionam a morfogénese e as suas interacções, e ainda a evolução temporal e mudanças que ocorrem ao longo do seu desenvolvimento (Mikos et al., 2010).

O sucesso da construção de tecidos de grandes dimensões depende da capacidade do scaffold de providenciar o ambiente e sinalização adequado para a regulação do destino das células no processo de reparação e regeneração (F.-M. Chen et al., 2012). Como scaffolds de MEC são capazes de reter toda a informação necessária para este fim estão a ser exploradas estratégias viáveis para a sua aplicação na construção de órgãos e tecidos complexos.

Uma estratégia que tem vindo a ser desenvolvida para a construção de estruturas complexas é a descellularização de tecidos ou órgãos com posterior celularização, com células previamente expandidas em cultura. Consiste na perfusão de detergentes através da rede vascular do órgão ou tecido, uma maneira eficiente e mais utilizada de descellularização. É um método que permite manter intacta a MEC e a rede vascular do tecido ou órgão; reduzir a distância de difusão destes agentes e facilita a remoção do material celular do tecido. A rede vascular permitirá a celularização e posterior crescimento celular, assim como o adequado fornecimento de oxigénio e nutrientes. Por meio desta técnica é possível a produção *ex vivo* de órgãos como os pulmões, o fígado, o pâncreas, o rim e o coração, e tecidos como a traqueia, o esófago e o músculo esquelético, de origem xenogénica ou alogénica. Estes estudos também sugerem que a MEC providencia a informação necessária para diferenciação e manutenção do fenótipo das células e serve como modelo tridimensional no qual vai ser reconstruído o tecido (Orlando et al., 2011; Soto-gutierrez, Wertheim, Ott, & Gilbert, 2012).

Esta estratégia apresenta algumas vantagens relativamente a dispensa de terapêutica imunossupressora e a disponibilidade de uma rede vascular intacta e de tamanho apropriado para a anastomose, quando a implantação da construção (Badylak, Weiss, Caplan, & Macchiarini, 2012).



**Figura 11. Construção de um tecido ou órgão complexo pelo método de descellularização e recelularização (Badylak et al., 2012)**

Como já foi referido, o método de descelularização deve remover as células do tecido ou órgãos sem provocar alterações na estrutura, composição da MEC e da rede vascular. Para alcançar este objectivo é empregue uma combinação de métodos físicos, químicos, iónicos e enzimáticos. A escolha do protocolo de descelularização e dos agentes irá depender do tecido ou órgão pretendido (Badylak et al., 2012; Soto-gutierrez et al., 2012). A descelularização de órgãos e de tecidos complexos requer técnicas dinâmicas de modo a obtermos uma maior eficácia na remoção do componente celular (Arenas-Herrera, Ko, Atala, & Yoo, 2013). Uma remoção incompleta do conteúdo celular pode levar ao desencadeamento de uma resposta inflamatória, é por este motivo que a estratégia de descelularização resulta de uma combinação de métodos (Badylak et al., 2012). Após o processo de descelularização é necessário avaliar o scaffold, por modo a determinar a extensão da descelularização e a avaliação dos possíveis danos causados à MEC (Arenas-Herrera et al., 2013).

A recelularização do tecido através da perfusão das células pela rede vascular providencia a estrutura e distribuição adequada das células a todo o tecido. O objectivo inicial deste método não é a recelularização total de todo o tecido, mas sim a disponibilidade de uma quantidade de células adequada e com distribuição espacial apropriada para promoção da proliferação e diferenciação. O uso de qualquer fonte de células autóloga elimina a necessidade de terapia imunossupressora. Podem assim ser utilizadas células primárias, obtidas na biopsia do tecido em causa; células precursoras; células estaminais adultas e células estaminais induzidas (Badylak et al., 2012). De modo a obtermos um processo de recelularização mais eficiente é possível a modificação da matriz descelularizada, criando um microambiente mais apropriado (Arenas-Herrera et al., 2013).

A primeira experiência com esta técnica foi num coração de rato. Após a descelularização, foi semeada por injeção com cardiomiócitos neonatais e por perfusão com células endoteliais aórticas. A construção exibiu a função contráctil, com a capacidade de funcionar como bomba. Porém a construção não foi posteriormente implantada (Morrison, 2009; Orlando et al., 2011). Outros órgãos foram construídos com esta técnica desde esta primeira experiência.

A engenharia dos tecidos e órgãos através de métodos de recelularização da MEC do órgão é uma alternativa promissora para os casos de falha renal crónica. A recelularização de MEC renal através da infusão pela artéria renal e o ureter de células

estaminais mostrou sucesso, em estudos de modelo animal. Foi possível observar proliferação e diferenciação celular específica ao nível do glomérulo (Badylak et al., 2012).

Mas algumas barreiras e questões permanecem: métodos de descelularização eficientes e que não alterem a estrutura da MEC, escolha da fonte de células mais adequada para cada tecido, quantidade de células a ser utilizada e método de recelularização eficiente. Também questões relacionadas com endotelização da rede vascular se demonstram ser importantes para o sucesso desta estratégia, uma incompleta endotelização leva a um risco de trombose. Mas esta é uma estratégia muito promissora para a construção de substitutos de órgãos e de tecidos complexos, havendo já obtido tecidos complexos anteriormente impossíveis de construir (Badylak et al., 2012; Soto-gutierrez et al., 2012).

### **4.3. Translação para clínica- regulamentação**

O grande objectivo da engenharia dos tecidos, não se encontra limitado a construção de tecidos em laboratório, mas assim a aplicação clínica dos tecidos construídos.

Muitos progressos têm vindo a ser feitos nesta área, contudo a maioria das construções obtidas ainda não são aplicadas de uma forma generalizada na prática clínica, ou seja, não se verificou ainda uma translação do laboratório para implantação em humanos (F.-M. Chen et al., 2012).

Alguns aspectos que têm vindo a atrasar a aplicação clínica são: biológicos, técnicos, clínicos e regulatórios. Como sabemos e já foi referido antes, parte do sucesso da translação para a clínica depende da vascularização da construção (F.-M. Chen et al., 2012). A melhoria deste parâmetro, através da aplicação de abordagens de vascularização como as descritas na secção anterior, permitirá a obtenção de melhores resultados da aplicação clínica das construções.

Na vertente de personalização das construções, é importante que haja a inclusão de biomarcadores que permitam identificar as moléculas responsáveis pela resposta adequada ao tratamento em cada doente. Também a existência de modelos animais que se assemelham pouco às dos humanos, em termos de características tecidulares e

tamanho, não permite uma boa previsão da eficácia das construções, quando aplicados em humanos. Torna-se necessário estabelecer um modelo animal padrão e a introdução de grandes modelos de animais em ensaios pré-clínicos(F.-M. Chen et al., 2012).

A constante evolução da regulamentação condiciona a aplicação atempada das descobertas no campo clínico, em termos de disponibilização de terapias seguras e eficazes(F.-M. Chen et al., 2012). Assim como outros aspectos, biológicos e técnicos, são importantes para a translação da engenharia de tecidos e órgãos para a prática clínica também a regulamentação deve ser mencionada.

O termo de produto de engenharia dos tecidos humanos não exhibe uma terminologia consensual, trata-se de um grupo de produtos com diversas aplicações e que suscitam um grande número de desafios, em termos da sua regulamentação. Consoante o país, diferentes regras são aplicadas aos produtos de engenharia dos tecidos. Na Europa, cada país regulamenta por diferentes mecanismos e regras. Alguns países ainda nem apresentam uma regulamentação, como por exemplo a Irlanda, a Finlândia e a Holanda. É assim necessária uma harmonização da regulamentação destes produtos, em termos de normas relativas a sistemas de qualidade, segurança biológica, gestão de riscos, terminologia e definições (Kent, Faulkner, Geesink, & FitzPatrick, 2006; Lloyd-evans, 2004).

Não podemos esquecer que estes produtos de engenharia de tecidos devem ser produzidos por processos de fabricação de alta qualidade, que sigam as boas práticas de fabricação (GMP), traduzindo-se assim em produtos seguros, de qualidade e eficazes (F.-M. Chen et al., 2012; Mikos et al., 2010). A aplicação destas normas de GMP é considerada importante e é implementada e seguida por todos os países.

A superação dos obstáculos regulamentares pode representar uma maior aplicação dos produtos de engenharia dos tecidos na prática clínica, sempre com a garantia de qualidade e segurança.

## Capítulo V – Conclusão

A engenharia dos tecidos e órgãos é uma área multidisciplinar. Para a obtenção de produtos com qualidade e funcionais a cooperação entre as várias disciplinas que a compõem tem que se manter activa e dinâmica.

Encontra-se assente em três pilares importantes que permitem a construção de tecidos: as células, os scaffolds e os factores de crescimento. Várias fontes de células podem ser utilizadas em engenharia dos tecidos, e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens. Contudo a escolha da mais indicada ainda não é bem perceptível e depende muito do tecido ou órgão que se pretende obter. Os scaffolds são estruturas importantes que providenciam informações importantes às células e influenciam a qualidade do tecido. Apesar de haver diversos materiais e métodos de fabrico que podem ser empregues na sua construção não podemos esquecer dos requisitos básicos que estes têm de preencher, requisitos como propriedades mecânicas, arquitectura e a biodegradabilidade. Muitas vezes é necessário a utilização de factores de crescimento, para a obtenção de uma melhor diferenciação e maturação do tecido. Tendo em conta esta necessidade, sistemas de entrega foram desenvolvidos de modo a garantir uma utilização mais apropriada e eficaz.

Alguns tecidos e mesmos órgãos já foram construídos com sucesso, desde estruturas simples, como enxertos de pele, até mais complexas como a construção da bexiga ou mesmo válvulas cardíacas. A conjugação entre células, scaffold e factores de crescimento condiciona o desenvolvimento com sucesso do tecido, daí diversas combinações terem sido utilizadas. Uma apresentam mais vantagens que outras, contudo todas permitiram a obtenção de conhecimentos importantes para uma melhoria das construções de engenharia dos tecidos.

Mas determinados desafios permanecem. A vascularização das construções é considerada o maior condicionante do sucesso. A inexistência de uma rede vascular eficiente, leva a morte de células e à perda de viabilidade da construção. Também a construção de órgãos inteiros e de tecidos complexos é um objectivo que ainda não foi atingido.

A engenharia dos tecidos apresenta-se como uma alternativa viável para contornar os obstáculos que outras medidas de substituição e reparação de órgãos apresentam, nomeadamente a falta de tecidos doados para o transplante. Apesar da disponibilidade dos produtos aplicados na clínica ainda ficar aquém do esperado, a engenharia dos

tecidos mantêm-se como uma ciência promissora e que pode mudar muito a medicina actual. Para concretização de todos os objectivos e a superação dos desafios é necessário manter a relação interdisciplinar entre os vários campos que a compõem, só assim poderemos desenhar melhores estratégias e produtos biológicos.

## Bibliografia

- Amabile, G., & Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 15(2), 59–68. doi:10.1016/j.molmed.2008.12.003
- Arenas-Herrera, J. E., Ko, I. K., Atala, A., & Yoo, J. J. (2013). Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomedical Materials*, 8(1), 1–9. doi:10.1088/1748-6041/8/1/014106
- Atala, A. (2007). Engineering tissues , organs and cells. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*, (1), 83–96. doi:10.1002/term
- Atala, A. (2011). Tissue engineering of human bladder. *British Medical Bulletin*, 97, 81–104. doi:10.1093/bmb/ldr003
- Atala, A. (2014). Organ preservation, organ and cell transplantation, tissue engineering, and regenerative medicine: the terms may change, but the goals remain the same. *Tissue Engineering. Part A*, 20(3-4), 445–6. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0742
- Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J., & Retik, A. B. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367(9518), 1241–6. doi:10.1016/S0140-6736(06)68438-9
- Badylak, S. F., Russell, A. J., & Santin, M. (2009). Introduction: History of Regenerative Medicine. In M. Satin (Ed.), *Strategies in Regenerative Medicine* (pp. 1–13). Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-74660-9\_1
- Badylak, S. F., Weiss, D. J., Caplan, A., & Macchiarini, P. (2012). Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*, 379(9819), 943–52. doi:10.1016/S0140-6736(12)60073-7
- Barrilleaux, B., Phinney, D. G., Prockop, D. J., & O'Connor, K. C. (2006). Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Engineering*, 12(11), 3007–19. doi:10.1089/ten.2006.12.3007
- Bártolo, P., Almeida, H., & Rezende, R. (2008). Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. In P. Bártolo & B. Bidanda (Eds.), *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications* (pp. 149–170). Springer. Disponível em [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-68831-2\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-68831-2_8)
- Bean, A. C., & Tuan, R. S. (2013). Stem cells and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine. In M. Ramalingam, E. Jabbari, S. Ramakrishna, & A. . Khademhosseini (Eds.), *Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues* (first edit., pp. 1–26). JohnWiley&Sons, Inc.
- Blum, H. E. (2014). Advances in individualized and regenerative medicine. *Advances in Medical Sciences*, 59(1), 7–12. doi:10.1016/j.advms.2013.12.001

- Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341–7. doi:10.1002/jcp.21200
- Cebotari, S., Lichtenberg, A., Tudorache, I., Hilfiker, A., Mertsching, H., Leyh, R., ... Haverich, A. (2006). Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation - Journal of the American Heart Association*, 114(1), I132–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001065
- Chang, H. M., Wang, Z. H., Luo, H. N., Xu, M., Ren, X. Y., Zheng, G. X., ... Wang, L. (2014). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)- based scaffolds for tissue engineering. *Journal of Medical and Biological Research*, 47(7), 533–539. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20143930>
- Chapekar, M. S. (2000). Tissue engineering: challenges and opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53(6), 617–20. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074418>
- Chen, F.-M., Zhang, M., & Wu, Z.-F. (2010). Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6279–308. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.053
- Chen, F.-M., Zhao, Y.-M., Jin, Y., & Shi, S. (2012). Prospects for translational regenerative medicine. *Biotechnology Advances*, 30(3), 658–72. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.11.005
- Chen, H., Liu, Y., Jiang, Z., Chen, W., Yu, Y., & Hu, Q. (2014). Cell-scaffold interaction within engineered tissue. *Experimental Cell Research*, 323(2), 346–51. doi:10.1016/j.yexcr.2014.02.028
- Chimutengwende-Gordon, M., & S. Khan, W. (2012). Advances in the Use of Stem Cells and Tissue Engineering Applications in Bone Repair. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(2), 122–126. doi:10.2174/157488812799219036
- Chua, C. (2001). Review The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *TISSUE ENGINEERING*, 7(6), 679–689.
- Chua, C. (2002). Review The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques. *TISSUE ENGINEERING*, 8(1), 1–11.
- Culme-Seymour, E. (2012). Cell Therapy and Regenerative Medicine Glossary. *Regenerative Medicine*, 7(3). doi:doi: 10.2217/rme.12.38
- Dionigi, B., & Fauza, D. O. (2012). Autologous Approaches to Tissue Engineering. In The Stem Cell Research Community (Ed.), *StemBook* (pp. 1–16). doi:10.3824/stembook.1.90.1
- Fuchs, J. R., Nasser, B. a, & Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann of Thoracic Surgery*, 72(2), 577–91. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515900>

- Global Observatory on Donation and Transplantation. (2013). *Organ Donation and Transplantation activities - 2012*. Disponível em <http://www.transplant-observatory.org/Pages/home.aspx>
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., & Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4-5), 352–66. doi:10.1016/j.addr.2011.01.005
- Hinderer, S., Seifert, J., Votteler, M., Shen, N., Rheinlaender, J., Schäffer, T. E., & Schenke-Layland, K. (2014). Engineering of a bio-functionalized hybrid off-the-shelf heart valve. *Biomaterials*, 35(7), 2130–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.080
- Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J. J. J. P., Fan, M., Chen, Z., & Jansen, J. a. (2011). Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical Research*, 28(6), 1259–72. doi:10.1007/s11095-010-0320-6
- Kent, J., Faulkner, a., Geesink, I., & FitzPatrick, D. (2006). Towards governance of human tissue engineered technologies in Europe: Framing the case for a new regulatory regime. *Technological Forecasting and Social Change*, 73(1), 41–60. doi:10.1016/j.techfore.2005.06.006
- Lázaro, I., Yilmazer, A., & Kostarelos, K. (2014). Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *Journal of Controlled Release*, 185, 37–44. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.011
- Lee, K., Silva, E. a, & Mooney, D. J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society Interface*, 8(55), 153–70. doi:10.1098/rsif.2010.0223
- Lloyd-evans, M. (2004). Regulating tissue engineering. *Materials Today*, 7(5), 48–55.
- Lovett, M., Ph, D., Lee, K., Edwards, A., & Kaplan, D. L. (2009). Vascularization Strategies for Tissue Engineering. *Tissue Engineering, Part B*, 15(3), 353–370.
- Mahfouz, W., Elsalmy, S., Corcos, J., & Fayed, a. S. (2013). Fundamentals of bladder tissue engineering. *African Journal of Urology*, 19(2), 51–57. doi:10.1016/j.afju.2013.01.006
- Meijer, G. J., Bruijn, J. D. De, Koole, R., & Blitterswijk, C. A. Van. (2007). Cell-Based Bone Tissue Engineering. *PLoS Medicine*, 4(2), 260–264. doi:10.1371/journal.pmed.0040009
- Mendelson, K., & Schoen, F. J. (2006). Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Annals of Biomedical Engineering*, 34(12), 1799–819. doi:10.1007/s10439-006-9163-z
- Metcalfé, A. D., & Ferguson, M. W. J. (2007). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells

- and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(14), 413–37. doi:10.1098/rsif.2006.0179
- Meyer, U. (2009). The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. In U. Meyer, H. Jörg, H. P. Wiesmann, & T. Meyert (Eds.), *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 5–12). Leipzig, Germany: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-77755-7
- Mikos, A. G., Herring, S. W., Ochareon, P., Lu, H. H., Kandel, R., Schoen, F. J., ... Kaplan, D. (2010). Engineering complex tissues. *Tissue Eng.*, 12(12), 1–55. doi:10.1089/ten.2006.12.3307.Engineering
- Mikos, A. G., & Temenoff, J. S. (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, 3(2), 1995–2000.
- Moreira-Teixeira, L. S., Georgi, N., Leijten, J., Wu, L., & Karperien, M. (2011). Cartilage tissue engineering. In C. Camacho-Hübner, O. Nilsson, & I L. Säwendahl (Eds.), *Cartilage and Bone Development and Its Disorders* (Vol. 21, pp. 102–15). doi:10.1159/000328140
- Moreno- Borchart, A. (2004). Building organs piece by piece. *EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION Reports*, 5(11), 1025–1028. Disponível em <http://embor.embopress.org/content/5/11/1025.abstract>
- Morrison, W. a. (2009). Progress in tissue engineering of soft tissue and organs. *Surgery*, 145(2), 127–30. doi:10.1016/j.surg.2008.07.017
- Nerem, R. N. (2008). An Introduction. In J. Polak, S. Mantalaris, & S. Harding (Eds.), *Advances in Tissue Engineering* (pp. 3–12). Singapore: Imerial College Press. Disponível em [http://books.google.pt/books?id=H44TTI5KE7MC&pg=PA349&lpg=PA349&dq=engineer+complex+tissues&source=bl&ots=f0j32JGR0J&sig=gqT0Ac\\_qnmgY36B16lW9iPEgax0&hl=pt-PT&sa=X&ei=gi9GVLWkD8yBaZ-RgLgL&sqi=2&ved=0CHIQ6AEwDA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=H44TTI5KE7MC&pg=PA349&lpg=PA349&dq=engineer+complex+tissues&source=bl&ots=f0j32JGR0J&sig=gqT0Ac_qnmgY36B16lW9iPEgax0&hl=pt-PT&sa=X&ei=gi9GVLWkD8yBaZ-RgLgL&sqi=2&ved=0CHIQ6AEwDA#v=onepage&q&f=false)
- Novosel, E. C., Kleinhans, C., & Kluger, P. J. (2011). Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4-5), 300–11. doi:10.1016/j.addr.2011.03.004
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- Olson, J. L., Atala, A., & Yoo, J. J. (2011). Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Medical Journal*, 47(1), 1–13. doi:10.4068/cmj.2011.47.1.1
- Orlando, G., Wood, K. J., Stratta, R. J., Yoo, J. J., Atala, A., & Soker, S. (2011). Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation*, 91(12), 1310–7. doi:10.1097/TP.0b013e318219ebb5

- Patterson, J., Martino, M. M., & Hubbell, J. a. (2010). Biomimetic materials in tissue engineering. *Materials Today*, 13(1-2), 14–22. doi:10.1016/S1369-7021(10)70013-4
- Polak, J. M., & Bishop, A. E. (2006). Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, 352–66. doi:10.1196/annals.1346.001
- Reinke, S., Dienelt, A., Blankenstein, A., Duda, G. N., & Geissler, S. (2014). Qualifying stem cell sources: how to overcome potential pitfalls in regenerative medicine? *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term.1923
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. a. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 434–41. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.009
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 743–65. doi:10.1002/mabi.200400026
- Schoen, F. J. (2008). Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation, Journal of the American Heart Association*, 118(18), 1864–80. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911
- Schulz, R. M., & Bader, A. (2007). Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *European Biophysics Journal*: EBJ, 36(4-5), 539–68. doi:10.1007/s00249-007-0139-1
- Shevchenko, R. V, James, S. L., & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(43), 229–58. doi:10.1098/rsif.2009.0403
- Soto-gutierrez, A., Wertheim, J. A., Ott, H. C., & Gilbert, T. W. (2012). Perspectives on whole-organ assembly: moving toward transplantation on demand. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3817–3823. doi:10.1172/JCI61974.Science
- The Merck Manual- Home edition. (n.d.). Disponível em <http://www.manualmerck.net/>
- Thomson, J. a. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Tuan, R. S., Boland, G., & Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy*, 5(1), 32–45. doi:10.1186/ar614
- Vacanti, C. A., Bonassar, L. J., Vacanti, M. P., & Shufflebarger, J. (2001). REPLACEMENT OF AN A VULSED B ONE. *The New England Journal of Medicine*, 344(20), 1511–1514. Disponível em [www.nejm.org](http://www.nejm.org)

- Vacanti, J. (2010). Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *Journal of Pediatric Surgery*, 45(2), 291–4. doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.10.063
- Vacanti, J., & Vacanti, C. A. (2007). The History and Scope of Tissue Engineering. In R. Lanza, R. Langer, & J. P. Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering* (third., pp. 3–6). Elsevier Academy Press. Disponível em [http://books.google.pt/books?id=rAFkm\\_4hOIMC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=rAFkm_4hOIMC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Vesely, I. (2005). Heart valve tissue engineering. *Circulation Research, Journal of the American Heart Association*, 97(8), 743–55. doi:10.1161/01.RES.0000185326.04010.9f
- Wong, D. J., & Chang, H. Y. (2009). Skin tissue engineering. In The Stem Cell Research Community (Ed.), *StemBook* (pp. 1–9). StemBook, ed. doi:10.3824/stembook.1.44.1
- Woodruff, M. A., Lange, C., Reichert, J., Berner, A., Chen, F., Fratzl, P., ... Hutmacher, D. W. (2012). Bone tissue engineering □: from bench to bedside The drive to develop bone grafts for the filling of major gaps in the skeletal. *Materials Today*, 15(10), 430–435. doi:10.1016/S1369-7021(12)70194-3
- X.Ma, P. (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, 7(5), 30–40.
- Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y., & Fu, J. (2013). Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(3), 327–339. doi:10.1002/jctb.3970

## Anexos

### Anexo I – Linha cronológica da história da Transplantação. Medicina regenerativa e engenharia dos tecidos (Orlando et al., 2011)

- 1818: First interhuman transfusion by Blundell ([http://en.wikipedia.org/wiki/Blood\\_transfusion](http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_transfusion)).
- 1885: Roux and Harrison establish the principle of tissue culture ([http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=Group\\_4\\_Project\\_-\\_Cell\\_Culture](http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=Group_4_Project_-_Cell_Culture)).
- 1901: Discovery of human blood group by Landstainer ([http://en.wikipedia.org/wiki/Blood\\_transfusion](http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_transfusion)).
- 1902: Carrel describes the triangulation method for vascular anastomosis (59, 60).
- 1902: The transplant era begins with the first successful autotransplant of a canine kidney to the dog's neck by Ullman (61).
- 1905: First successful cornea transplant by Zirm (62).
- 1906: Jaboulay (63) attempts renal xenotransplantation in 2 patients who receives organs from pig and goat, respectively.
- 1912: Formulation of guidelines for aseptic techniques to reduce cell culture contamination by Carrel ([http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=Group\\_4\\_Project\\_-\\_Cell\\_Culture](http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=Group_4_Project_-_Cell_Culture)).
- 1916: First inter-human transfusion using blood that had been grouped, stored, and cooled ([http://en.wikipedia.org/wiki/Blood\\_transfusion](http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_transfusion)).
- 1930s: Carrel and Lindbergh develop the perfusion pump (6, 7).
- 1944: First successful dialysis to support renal function, by Kolff et al. (64).
- 1954: First successful kidney transplant between identical twins by Murray (8).
- 1956: First successful bone marrow transplant between an identical twin as donor and a recipient with leukemia is performed by Thomas (64).
- 1958: Dausset discovers the first human leukocyte antigen (66).
- 1963: First proof of the existence of stem cells in the bone marrow by Till and coworkers (67).
- 1963: First single hand transplant in Ecuador but inadequate immunosuppression did not allow good outcome. Removal after 3 wk (68).
- 1963: Reemtsma (69) attempts renal xenotransplantation in 6 patients, one of whom survives 9 mo.
- 1966: First successful pancreas transplant by Lillehei and Kelly ([http://en.wikipedia.org/wiki/Organ\\_transplantation](http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_transplantation)).
- 1967: First successful liver transplant by Starzl ([http://en.wikipedia.org/wiki/Organ\\_transplantation](http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_transplantation)).
- 1967: First successful heart transplant by Barnard ([http://en.wikipedia.org/wiki/Organ\\_transplantation](http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_transplantation)).
- 1968: First successful human bone marrow transplant between non-twinsiblings by Good (<http://www.fhcrc.org/science/clinical/ltfu/faqs/transplantation.html>).
- 1973: First bone marrow transplant from an unrelated donor (<http://www.fhcrc.org/science/clinical/ltfu/faqs/transplantation.html>).
- 1981: First successful heart/lung transplant by Reitz ([http://en.wikipedia.org/wiki/Organ\\_transplantation](http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_transplantation)).
- 1981: First tissue-engineered product, a living, autologous human skin epithelium, implanted in burn patients (13–15).
- 1983: First successful lung lobe transplant by Cooper ([http://en.wikipedia.org/wiki/Organ\\_transplantation](http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_transplantation)).
- 1984: Willadsen cloned a sheep from embryo cells, the first verified example of mammal cloning using the process of nuclear transfer (34, 35).
- 1983: First xenotransplantation of a heart into a newborn. The recipient died 21 d later of a kidney infection (70, 71).
- 1986: First successful double-lung transplant by Cooper ([http://en.wikipedia.org/wiki/Organ\\_transplantation](http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_transplantation)).
- 1992: First xenotransplantation of bone marrow. Bone marrow and a kidney from a baboon are transplanted into a patient. The patient dies 26 d later (71).
- 1993: First baboon-to-human liver transplantation by Starzl and coworkers (71).
- 1996: Wilmut et al. (36) clone the first organism ever to be cloned from adult cells, Dolly.
- 1997: The Harvard mouse (29).
- 1998: First description of human embryonic stem cells by Thompson et al. (33).
- 1998: First successful hand transplant (68).
- 1999: First successful tissue engineered bladder transplanted by Atala et al. (9).
- 2001: First implantation of bioengineered vessels by Shinoka et al. (11).
- 2004: First successful bioengineered urethra by Atala (10).
- 2005: First successful partial face transplant (72).
- 2005: First implantation of fully autologous vessel grafts by McAllister et al. (12) and L'Heureux et al. (13).
- 2006: First jaw transplant to combine donor jaw with bone marrow from the patient, by Genden (68).
- 2008: Taylor announces the production of the first CMO (namely, the heart) fully engineered ex vivo starting from acellular rat hearts (19).
- 2008: First successful complete full double arm transplant by Biemer, Höhnke and Stangl (68).
- 2008: First transplant of a human windpipe using a patient's own stem cells, by Macchiarini and Birchall (18).
- 2010: Liver and lung organoids are manufactured by the groups of Uydun et al. (20), Atala and coworkers (21), Niklason and coworkers (22), and Vacanti and coworkers (23) groups.
- 2010: Ingber and coworkers (73) announces the production of the first biomimetic microsystem that reconstitutes the critical functional alveolar-capillary interface of the human lung ("lung-on-a-chip").
- 2010: First full facial transplant, by Barret (<http://www.bbc.co.uk/news/health-10765005>).
- 2010: First trial of ESC in humans (<http://www.geron.com/media/pressview.aspx?id=1235>).
- 2010: First combined trachea-larynx transplant in California by a multidisciplinary team (<http://www.bbc.co.uk/news/health-12228027>).

## Anexo II – Construções de substitutos de pele disponíveis no mercado para aplicação clínica (Groeber et al., 2011)

**Table 1**  
Commercially available epidermal constructs for clinical use.

Brand name/manufacturer	Graft type			Cell source	Biomaterial	Life-span
	Cell-free	Cell-based	Cell-seeded scaffold (TE)			
CellSpray Clinical Cell Culture (C3), Perth, Australia		x		Autologous keratinocytes	–	Permanent
Epicel Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA, USA		x, cell sheet		Autologous keratinocytes	–	Permanent
EpiDex Modex Therapeutiques, Lausanne, Switzerland		x, cell sheet		Autologous keratinocytes	–	Permanent
EPiBASE Laboratoires Genevrier, Sophia-Antipolis, Nice, France		x, cell sheet		Autologous keratinocytes	–	Permanent
MySkin CellTran Ltd, Sheffield, UK			x	Autologous keratinocytes	Synthetic, silicone support layer with a specially formulated surface coating	Permanent
Laserskin or Vivoderm Fidia Advanced Biopolymers, Padua, Italy			x	Autologous keratinocytes	Recombinant, (HAM)	Permanent
Bioseed-S BioTissue TechnologiesGmbH, Freiburg, Germany			x	Autologous keratinocytes	Allogeneic, fibrin sealant	Permanent

HAM: hyaluronic acid membrane (microperforated).

**Table 2**  
Commercially available dermal constructs for clinical use.

Brand name/manufacturer	Graft type			Cell source	Biomaterial	Life-span
	Cell-free	Cell-based	Cell-seeded scaffold (TE)			
AlloDerm LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, USA	x			–	Allogeneic human acellular lyophilized dermis	Permanent
Karoderm KaroCell Tissue Engineering AB, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden	x			–	Allogeneic human acellular dermis	Permanent
SureDerm HANS BIOMED Corporation, Seoul, Korea	x			–	Allogeneic human acellular lyophilized dermis	Permanent
GraftJacket Wright Medical Technology, Inc., Arlington, TN, USA	x			–	Allogeneic human acellular pre-meshed dermis	Permanent
Matriderm Dr Suwelack Skin and HealthCare AG, Billerbeck, Germany	x			–	Xenogeneic bovine non-cross-linked lyophilized dermis, coated with $\alpha$ -elastin hydrolysate	Permanent
Permacol Surgical Implant Tissue Science Laboratories plc, Aldershot, UK	x			–	Xenogeneic porcine acellular diisocyanite cross-linked dermis	Permanent
OASIS Wound Matrix Cook Biotech Inc, West Lafayette, IN, USA	x			–	Xenogeneic porcine acellular lyophilized small intestine submucosa	Permanent
EZ Derm Brennen Medical, Inc., MN, USA	x			–	Xenogeneic porcine aldehyde cross-linked reconstituted dermal collagen	Temporary
Integra Dermal Regeneration Template Integra NeuroSciences, Plainsboro, NJ, USA	x			–	Xenogeneic and synthetic: polysiloxane, bovine cross-linked reconstituted	Semi-permanent
Terudermis Olympus Terumo Biomaterial Corp., Tokyo, Japan	x			–	Xenogeneic and synthetic: silicone, bovine lyophilized cross-linked collagen sponge made of heat-denatured collagen	Semi-permanent
Pelnac Standard/Pelnac Fortified Gunze Ltd, Medical Materials Center, Kyoto, Japan	x			–	Xenogeneic and synthetic: silicone/silicone fortified with silicone gauze TRES, atelocollagen derived from pig tendon	Semi-permanent
Biobrane/Biobrane-L UDI Laboratories, Inc., Rockford, IL, USA	x			–	Xenogeneic and synthetic: silicone film, nylon fabric, porcine collagen	Temporary
Hyalomatrix PA Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy	x			–	Allogeneic and synthetic: HYAFF layered on silicone membrane	Semi-permanent
TransCyte (DermagraftTC) Advanced BioHealing, Inc., New York, NY and La Jolla, CA, USA			x	Neonatal allogeneic fibroblasts	Xenogeneic and synthetic: silicone film, nylon mesh, porcine dermal collagen	Temporary
Dermagraft Advanced BioHealing, Inc., New York, NY and La Jolla, CA, USA			x	Neonatal allogeneic fibroblasts	Allogeneic and synthetic: PGA/PLA, ECM	Temporary
Hyalograft 3D Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy			x	Autologous fibroblasts	Allogeneic: HAM	Permanent

PGA: polyglycolic acid (Dexon).

PLA: polylactic acid (Vicryl).

ECM: extracellular matrix.

HAM: hyaluronic acid membrane (microperforated).

**Table 3**  
Commercially available epidermal/dermal constructs for clinical use.

Brand name/manufacturer	Graft type			Cell source	Biomaterial	Life-span
	Cell-free	Cell-based	Cell-seeded scaffold (TE)			
Apligraf Organogenesis Inc., Canton, Massachusetts, CA, USA			x	Allogeneic keratinocytes and fibroblasts	Bovine collagen	Temporary
OrCel Ortec International, Inc., New York, NY, USA			x	Allogeneic keratinocytes and fibroblasts	Bovine collagen sponge	Temporary
PolyActive HC Implants BV, Leiden, The Netherlands			x	Autologous keratinocytes and fibroblasts	Synthetic, ... (PEO/PBT)	Temporary
TissueTech Autograft System (Laserskin and Hyalograft 3D) Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy			x	Autologous keratinocytes and fibroblasts	Recombinant, HAM	Temporary

PEO: polyethylene oxide terephthalate.

PBT: polybutylene terephthalate.

HAM: hyaluronic acid membrane (microperforated).