

Bioengenharia de tecido epitelial e cartilaginoso*

Bioengineering of epithelial and cartilaginous tissues

Marcella Motta da Costa
Paulo Roberto Martins Queiroz

Resumo

A bioengenharia tecidual ou medicina regenerativa é a área da biomedicina que engloba uma abordagem multidisciplinar na aplicação de princípios das ciências biológicas e das engenharias de materiais, no desenvolvimento de técnicas que promovam a expansão *in vitro* de células sobre um suporte de biopolímeros biorreabsorvíveis. Neste artigo será realizada uma revisão bibliográfica a respeito dos princípios, métodos e aplicações da bioengenharia de tecidos. A construção do suporte permite criar condições ideais de reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos lesionados, fornecendo elementos celulares requeridos, fatores de proliferação e diferenciação celular que podem garantir a geração de quantidade suficiente de células novas e de estruturas supramoleculares que providenciem a organização espacial plenamente funcional de novos tecidos gerados e a sua integração sistêmica. Muitas novidades ainda são aguardadas no que diz respeito a novas tecnologias na construção de suporte, visto que a expectativa para o futuro é a possibilidade de reconstrução de órgãos.

Palavras-chave: Bioengenharia de tecido. Regeneração tecidual. Produção de suporte.

Abstract

The bioengineered tissue or regenerative medicine is the field of biomedicine that includes a multidisciplinary approach in the application of principles of biological science and engineering of materials, the development of techniques that promote the *in vitro* expansion of cells on a base of bioresorbable polymers. In this article will be accomplished a bibliographic review about the principles, methods and applications of bioengineered tissue. By building support seeks to create ideal conditions for repair, regeneration and/or replacement of damaged tissues providing cellular elements required factors, cell proliferation and differentiation that can guarantee the generation of enough new cells and supramolecular structures that provide the spatial organization fully functional new tissues generated and its systemic integration. Many novelties are still awaited with regard to new technologies in building support, since the expectation for the future is the possibility of organ reconstruction.

Keywords: Bioengineering of tissue. Tissue regeneration. Production support.

1 Introdução

A bioengenharia de tecidos está atualmente inserida no contexto da medicina regenerativa a qual busca criar condições ideais para reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos lesionados, fornecendo elementos requeridos para a proliferação e diferenciação celular que podem garantir a geração de quantidade suficiente de células novas e de estruturas supramoleculares que providenciam a organização espacial plenamente funcional de novos tecidos gerados e a sua integração sistêmica (BOROJEVIC, 2008).

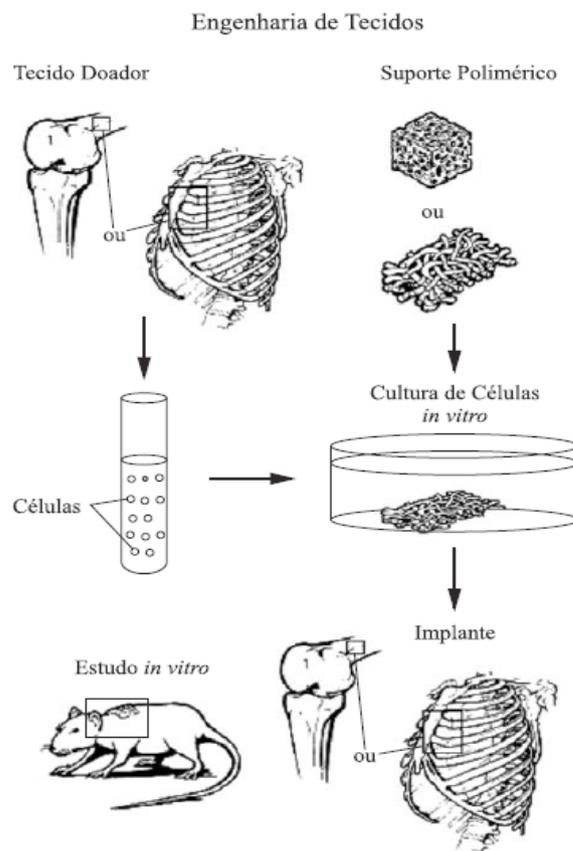
Grandes lesões teciduais originadas normalmente por traumas mecânicos, queimaduras ou doenças degenerativas, por décadas foram motivos de problemas tendo em vista a escassez de recursos e de conhecimentos terapêuticos da época. Procedimentos antes utilizados, tais como, a remoção da região lesionada, foram substituídos por implantes feitos de biomateriais, os quais podem ser classificados em permanentes ou temporários, quando comparados à permanência deles no corpo humano. Tais implantes são criados para atuar na interface com os tecidos receptores do organismo, interagindo com eles, gerando assim respostas fisiológicas do organismo que vão desde o crescimento celular até a sua diferenciação nos sítios de implantação (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Novos estudos vêm concebendo um maior entendimento dos mecanismos de interação das células com a matriz extracelular, bem como a sua influência direta no crescimento e na diferenciação celular. Esse maior conhecimento tem sido utilizado na produção de biomateriais capazes de mimetizar as características da matriz extracelular originária, exercendo assim um papel ativo na restauração tecidual, como exemplo do “Esquema representativo da técnica de engenharia de tecido”. Por preencherem temporariamente a região lesionada, os implantes temporários vêm sendo utilizados com maior frequência, à medida que são degradados e/ou absorvidos pelo organismo, estimulando a regeneração da região alvo (SANTOR JR; BARBANTI; DUEK; WADA, 2009).

A seleção do suporte para as células é basicamente o primeiro passo e mais importante, ao se tentar promover uma reconstrução de órgãos ou tecidos. Tal seleção deve ser baseada tanto no tipo de lesão, localização e ex-

tensão, uma vez que uma compatibilidade morfológica e química é de extrema importância para o sucesso do implante (SANTOS JR; WADA, 2007).

Figura 1 - Esquema representativo da técnica da engenharia de tecido.



Fonte: Barbanti, Zavaglia e Duek (2005).

A produção do suporte necessário para o acondicionamento das células e dos biopolímeros é realizada em laboratório por diversas formas de fabricação, entre elas a mais utilizada e encontrada na literatura já existente é a prototipagem rápida, na qual há a estruturação das várias camadas do suporte, conjuntamente com os biopolímeros biorreabsorvíveis, uma matriz celular estruturada e as células tronco-alvo que serão diferenciadas no tecido produzido (OLIVEIRA et al., 2006).

A estrutura em um plano 3D tem sido a novidade tecnológica na produção de suportes na bioengenharia de tecidos, já que, ao se obter tecnologia para tal produção, é possível originar um suporte com maior fidelidade quanto ao plano e à quantidade de camadas existentes no tecido original, aproximando-se ao máximo das características físico-mecânicas, moleculares, bioquímicas, estéticas e fisiológicas (HUTMACHER; SITTINGER; RISBUD, 2004).

O maior foco da bioengenharia de tecido hoje é a possibilidade de reconstrução de pele, de ossos e de cartilagens lesionadas no corpo humano por qualquer tipo de trauma mecânico, químico ou físico e, principalmente, a possibilidade futura da produção de órgãos humanos fiéis e funcionais aos pacientes necessitados de transplantes (CARVALHO et al., 2010).

A partir dessas informações, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica a respeito dos princípios, métodos e aplicações da bioengenharia de tecidos.

2 Matriz extracelular dos tecidos

Os tecidos conjuntivos são responsáveis pela manutenção e pelo estabelecimento da forma do corpo, fazendo a ligação entre as células e os órgãos, mantendo-os unidos e dando suporte mecânico às estruturas dos órgãos. Estruturalmente é constituído por três classes de componentes: células e matriz extracelular, sendo ela formada por fibras e substância fundamental amorfa. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Nos tecidos epiteliais e cartilagosos, a matriz extracelular consiste em uma importante estrutura que é caracterizada por diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substâncias fundamentais, as quais consistem de um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanas e proteoglicanas) e glicoproteínas multiadesivas (laminina e fibronectina, dentre outras) que se ligam às integrinas receptoras presentes na membrana celular, conferindo assim força tênsil e rigidez à matriz conjuntiva (KESSEL, 2001).

A ampla variedade de tecidos conjuntivos reflete diretamente na quantidade existente de seus três componentes básicos, proporcionando a cada um dos tecidos conectados por esse tecido de apoio as suas características mecânicas estruturais. Das células constituintes do tecido conjuntivo, a mais importante é o fibroblasto, responsável pela síntese das fibras colágena, elástica e reticular, além das glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que são parte da matriz conjuntiva (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

De uma forma geral, há o predomínio de fibras nas estruturas dos tecidos cartilaginoso e epitelial. Essas fibras são formadas por proteínas que se polimerizam formando estruturas muito alongadas. As fibras do tecido

conjuntivo são divididas em colágenas, reticulares e elásticas, as quais são variáveis em seu número nos diferentes tipos de tecidos conjuntivos, já que conferem a cada um deles um suporte mecânico e estrutural condizente com as suas funções estabelecidas no corpo humano. A substância fundamental tem seu papel no preenchimento dos espaços entre as células e as fibras do tecido e, sendo viscosa, atua tanto como lubrificante quanto um tipo de barreira natural à penetração de microrganismos invasores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011; POIRIER, 2003).

As glicosaminoglicanas são polímeros lineares formados por unidades repetidas de dissacarídeos, usualmente compostos de ácido hialurônico e de hexosaminas, que podem ser glicosaminas ou galactosaminas. Todas essas cadeias lineares são ligadas covalentemente a um eixo protéico, formando a molécula de proteoglicana, também concomitantemente existente na matriz com as glicosaminoglicanas. Outro componente da matriz são as glicoproteínas multiadesivas que são compostas de proteínas ligadas à cadeia de glicídios, sendo a fibronectina e a laminina as principais glicoproteínas existentes em nosso organismo (KESSEL, 2001).

Dessa forma, a matriz extracelular desempenha o papel de conexão direta das células em suas individualidades com os órgãos dos quais fazem parte, servindo inclusive como um meio excelente para a troca de nutrientes e catabólitos das células com seu devido aporte sanguíneo. Em casos de regeneração, essa estrutura complexa deverá ser totalmente refeita para garantir a sobrevivência do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Vários dos componentes da matriz extracelular devem ser minuciosamente estudados, principalmente quando o *scaffold* (suporte) for usado como base de suporte para células-tronco como um determinado sistema de cultura, visto que essa matriz não somente irá servir para o preenchimento da estrutura, mas efetivamente está associada a uma resposta biológica específica com sinais que incluem: corrente elétrica, conformação molecular, estado de agregação que permita a permeabilidade de nutrientes e a incorporação ao tecido receptor. Além disso, a matriz também deve comportar o crescimento celular por apresentar propriedades mecânicas específicas condizentes em relação ao tecido a ser reconstruído e, também, induzir uma resposta celular mais rápida ou, ainda, produzir intrinsecamente propriedades relacionadas com a remodelagem do tecido lesionado (OLSSON et al., 2008).

3 Suportes 2D e 3D

A estrutura do suporte deve possuir cinco fatores considerados fundamentais: a) não possuir nenhum componente ou subproduto de sua degradação que provoque uma reação inflamatória ou tóxica ao organismo; b) ter uma superfície que permita o crescimento e adesão celular; c) apresentar uma estrutura tridimensional compatível à região lesionada; d) obter uma porosidade que proporcione uma elevada área superficial para a interação célula-*scaffold*, principalmente canais porosos para a migração de células e passagem dos vasos sanguíneos; e) necessidade de espaço suficiente para a regeneração da matriz extracelular do tecido (OLSSON et al., 2008).

Na produção do suporte base, **há três principais abordagens para a bioengenharia tecidual:**

1) Utilização de células isoladas ou substitutos celulares. Sendo evitada então a intervenção cirúrgica, o que permite a substituição somente das células que possam suprir a função tecidual correspondente e permitir a manipulação dessas células antes da implantação. Suas limitações potenciais incluem a falha na manutenção da função original do infundido celular e, principalmente, uma possível rejeição imunológica;

2) Utilização de substâncias indutoras de crescimento capazes de promover a regeneração celular. Esta abordagem depende essencialmente da qualidade na purificação e produção em larga escala de moléculas sinalizadoras, como os fatores de crescimento e, em muitos casos, o desenvolvimento de métodos eficazes para a integração dessas moléculas no suporte escolhido;

3) A escolha das células utilizadas sobre ou dentro da matriz extracelular utilizadas em uma combinação com os biomateriais no suporte, geralmente em forma de andaimes (LANGER; VACANTI, 1993).

Em sistemas fechados, as células são isoladas do corpo por uma membrana que permite a permeabilidade de nutrientes e resíduos, mas impede a entrada de grandes entidades, como anticorpos ou células imunes que pos-

sam destruir o implante; assim, esses implantes podem ser utilizados na forma de dispositivos extracorpóreos.

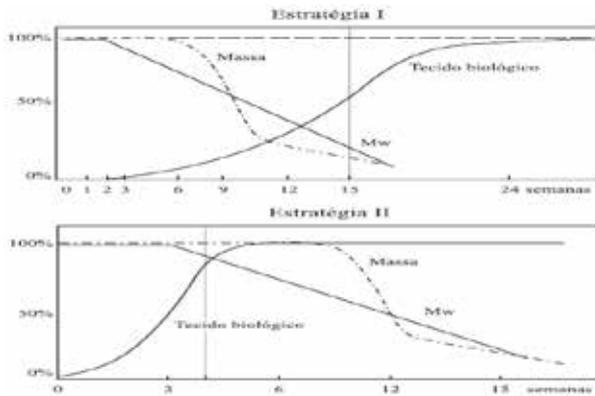
Em sistemas abertos, as células são associadas à matriz extracelular no suporte ao serem implantadas, incorporam-se ao organismo (KHADEMHOSEIMI et al., 2005).

O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa essencialmente à seleção do suporte e seus biopolímeros para as células, tendo em vista que é de fundamental importância se levar em consideração tanto o tipo e o local da lesão, como também, o tempo de degradação do polímero, já que sua ligação é diretamente proporcional à produção ou não de matriz extracelular do tecido regenerado, seguindo duas estratégias de aplicação (Figura 2).

A primeira consiste no desenvolvimento de um suporte devidamente capaz de suportar física e mecanicamente as células, desde o inóculo até o reimplante no organismo, onde o conjunto de polímero e células é remodelado pela degradação *in vivo*, em uma razão proporcional ao crescimento celular. Essa estratégia basicamente tem a função de proporcionar suporte para o crescimento celular e, adicionalmente, servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original do novo tecido e sua biorreabsorção completa (BARBANTI ; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Na segunda estratégia, o implante é realizado com o tecido maduro já formado, onde o suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção em um biorreator, no qual ocorrerá a formação do tecido maduro *in vivo*. Nesta etapa, há a secreção de matriz extracelular durante a cultura *in vitro* conforme a proliferação celular, enquanto o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular e a formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Figura 2 – Estratégias tipo I e tipo II de seleção de polímeros biorreabsorvíveis. Nota-se na figura de Estratégia I uma progressiva degradação do *scaffold*, representado pela linha pontilhada, concomitantemente ao crescimento exponencial do tecido biológico, representada pela linha contínua. Na figura da Estratégia II, há o crescimento do tecido biológico anteriormente ao maior nível de degradação progressiva da massa do *scaffold*.



Fonte: Barbanti, Zavaglia e Duek (2005).

Uma boa estrutura de suporte deve levar em consideração as características básicas da matriz extracelular do tecido alvo em seu estado nativo. No entanto as múltiplas funções e a natureza dinâmica da matriz extracelular podem tornar difícil a reprodução fiel pelo suporte. Portanto, o conceito atual de andaimes na bioengenharia tecidual tenta reproduzir pelo menos parcialmente as funções da matriz. O importante papel desempenhado pelo *scaffold* em tecidos artificiais é análogo às funções da matriz e está associado às suas funções arquitetônicas, características biológicas e mecânicas (HUTMACHER; SITTINGER; RISBUD, 2004).

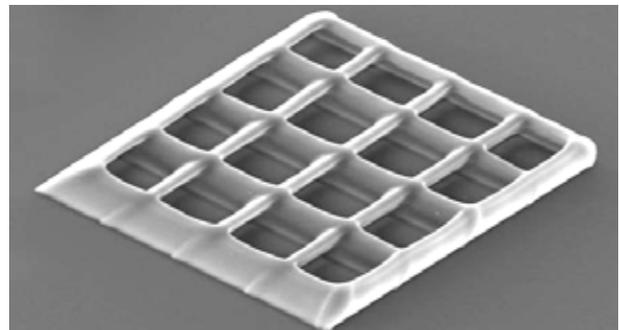
Sob a visão da arquitetura, os andaimes devem fornecer volume próprio para a vascularização do novo tecido e remodelação de forma a facilitar a integração dos biopolímeros e as células quando implantadas. Nesse caso, os biopolímeros devem ser processados de forma a proporcionar uma estrutura porosa o suficiente para o transporte adequado de substâncias e metabólitos orgânicos sem comprometer significativamente a estabilidade mecânica do andaime. Outro ponto fundamental na obtenção do *scaffold* ideal é a citocompatibilidade dos tecidos conjuntivos, para os quais os andaimes construídos forneçam suporte seguro para que as células implantadas possam se anexar, crescer e se diferenciar durante a cultura *in vitro* e *in vivo* (JAKAB et al., 2004).

Torna-se então essencial a utilização de biomateriais compatíveis com os componentes celulares do tecido de origem, bem como a compatibilidade com as células usadas. A bioatividade, que consiste na interação adequada com as células e seus componentes histológicos, facilita a regulação de suas atividades biológicas no momento da expansão *in vitro* (CHAN; LEONG, 2008).

Os biomateriais devem incluir sinais biológicos, como células adesivas ligantes que aumentam a fixação e os sinais físicos do suporte. Levando-se em consideração as propriedades mecânicas, os andaimes devem fornecer estabilidade à estrutura física exigida pelo tecido, de forma a suportar trações ou movimentações características ao local de implantação do suporte (CHAN; LEONG, 2008).

A produção de *scaffolds* com dupla camada (2D) consiste basicamente na estruturação do suporte na forma de uma camada de biopolímeros (Figura 3) conjuntamente com fatores de crescimento e matriz extracelular sobreposta por outra camada contendo as células que são capazes de se diferenciar na estrutura física do tecido alvo de regeneração (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Figura 3 - Estrutura Bidimensional (2D) polimérica utilizada como *scaffold* em estruturas de bioengenharia de tecido.



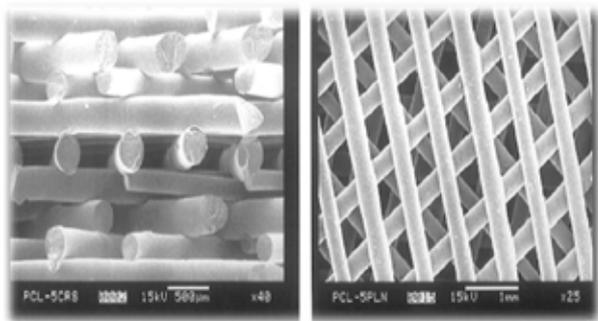
Fonte: (HUTMACHER; SITTINGER; RISBUD, 2004)

Destaca-se a técnica de evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal para a confecção de um suporte com aproximadamente 70-90% de porosidade, a qual pode ser controlada pela quantidade de sal adicionado e o tamanho dos poros pelo tamanho dos cristais de sal. Essa técnica se destaca pela boa reprodutibilidade juntamente com a sua grande capacidade de interconexão entre os poros. Ela tem se tornado de grande utilidade na formação de *scaffolds* epiteliais, visto que o possível controle da quantidade e o tamanho dos poros influenciam

diretamente na capacidade de vascularização necessária no tecido citado (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Em uma forma tripla de superfície, a estrutura 3D (Figura 4) tem se mostrado um composto mais versátil na construção de suportes, visto que suas dimensões se tornam mais capazes de obter a forma adequada do tecido original, proporcionando então a facilidade de preenchimento total do local, bem como visando à estética da regeneração. Os biopolímeros aqui utilizados são incluídos no suporte de forma a se estruturarem como uma rede geométrica tridimensional após seu processamento e, posteriormente, passível de se inocular a população de células sobre o suporte. Após a interação *scaffold*-células a indução de crescimento celular é promovida, originando um tecido prematuro, o qual será expandido em um biorreator. Quando implantado, tal suporte sofre a ação orgânica do corpo e é incorporado de forma a absorver a matriz extracelular contida no suporte e promover a diferenciação celular *in vivo*. O destaque dessa técnica se dá frente a uma degradação lenta, pois a matriz 3D possui condições de manter sua integridade estrutural e propriedades mecânicas durante o preparo *in vitro* e/ou nos processos de remodelação tecidual *in vivo* (KAPFER, 2011).

Figura 4 – Estrutura Tridimensional polimérica, conferida por uma sobreposição de camadas de biopolímeros formando a estrutura 3D.



Fonte: (HUTMACHER; SITTINGER; RISBUD, 2004)

Na literatura se destaca como técnica de obtenção do suporte 3D a tecnologia de prototipagem rápida (também chamada de fabricação de forma livre sólida), que consiste na construção de peças por meio da utilização de materiais seletivamente acrescentados camada a camada conforme é especificado por um computador, no qual cada camada representa a forma da seção transversal do modelo em um nível específico, proporcionando assim a obtenção de formas mais complexas. Para essa finalidade, é utilizado um conjunto de tecnologias que possuem

em comum a construção de protótipos físicos a partir de seus análogos virtuais; por isso se torna de fundamental importância o conhecimento prévio da real estrutura do tecido que será regenerado. Não somente a estruturação geométrica é favorável nessa técnica, mas também o controle com precisão da arquitetura da matriz como tamanho, forma, interconectividade, ramificação geométrica e orientação, tendo estruturas biomiméticas variando o desenho e a composição de materiais, aumentando, então, o controle sobre as propriedades mecânicas, os efeitos biológicos e a cinética de degradação do composto (OLIVEIRA et al., 2006).

O desenvolvimento de sistemas livres de solventes e de base aquosa proporcionou um marco recente nessa técnica, visto que a possibilidade de inclusão de componentes bioativos, tais como, fatores de crescimento, células e medicamentos favorecem novas oportunidades para a bioengenharia tecidual (HUTMACHER; SITTINGER; RISBUD, 2004; JAKAB et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

4 Polímeros e seus mimetismos

As duas estratégias anteriormente citadas são baseadas em três conceitos da bioengenharia: biodegradação, bioabsorção e biorreabsorção. Segundo Vert et al. (1992):

- Biodegradável é um termo utilizado para o polímero e dispositivos sólidos que, devido à degradação macromolecular, sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo;
- Bioabsorvível representa os materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição da sua massa molecular;
- Biorreabsorvíveis são os materiais poliméricos que apresentam degradação por meio da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, além de serem totalmente eliminados e seus subprodutos de degradação, sem efeitos colaterais (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Os dispositivos biorreabsorvíveis são os polímeros mais utilizados, estando em maior destaque os baseados em poliésteres derivados de alfa-hidroxiácidos, como o poli(L-ácido láctico) (PLLA), o poli(D-ácido láctico) (PDLA), o poli(DL-ácido láctico) (PDLLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e a policaprolactona (PCL). Os processos de degradação desses polímeros são resultantes da quebra em várias unidades menores pela hidrólise simples e os seus subprodutos são necessariamente eliminados do organismo por meio das vias metabólicas, como a via do ciclo do ácido cítrico ou diretamente por excreção renal. E, exatamente por possuírem essas características de rápida degradação e fácil eliminação, esses polímeros se encontram entre os mais utilizados, uma vez que o essencial de um biopolímero é a sua capacidade eficiente de induzir uma resposta celular e ser de rápida excreção. Há também a caracterização do mimetismo específico de certos polímeros por cada tecido quando levado em consideração a estrutura, a necessidade de porosidade maior ou menor e os processos mecânicos de resistência únicos a cada parte tecidual de regeneração alvo (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006; SANTOS JR.; WADA, 2007).

Outros biopolímeros utilizados são os polihidroxialcanoatos, dentre os quais se destacam o poli(3-hidroxibutirato) (PHB), o poli(4-hidroxibutirato) (P4HB), o copolímero de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxihexanoato e o poli(3-hidroxioctanoato) (PHO) (SADER; FERREIRA; DIAS, 2006).

Seguindo as características de avascularização e a existência de dois tipos básicos de células que são os condrocitos e os condroblastos e sua composição essencialmente de matriz extracelular contendo essencialmente colágeno e glicosaminoglicanas, o tecido cartilaginoso necessita, para a sua regeneração, de compostos menos porosos e de maior resistência mecânica que acaba por mimetizar o PLLA e o PGA bem como os seus copolímeros. Estudos posteriores concluíram que células obtidas de cartilagem humana, mantidas em cultura sobre dispositivos constituídos por diferentes poliésteres biorreabsorvíveis mostraram que o processo de adesão celular era proporcional à hidrofiliabilidade dos polímeros, provando assim o seu maior mimetismo pelo PLLA. Tentando mimetizar de forma mais eficaz o ambiente natural das células cartilaginosas, Takagi e colaboradores (2004) desenvolveram um dispositivo tridimensional composto por colágeno e pelo copolímero do PLLA como ácido

poliglicurônico, visto que ele é um dos componentes que formam as moléculas de glicosaminoglicanas existentes na matriz extracelular dos tecidos. Outros autores demonstraram que células cartilaginosas, quando cultivadas no interior de arcaçouço, foram capazes de consumir glicose do meio de cultura para produzir componentes essenciais da matriz extracelular típicos do tecido cartilaginoso (SANTOS JR.; WADA, 2007; MA, 2008).

Visando à restauração dérmica, os polímeros naturais são muito estudados; dentre eles destaca-se o colágeno por ser extremamente receptivo à cultura de fibroblastos, os quais, quando sobre géis de colágeno, mostram-se capazes de produzir componentes da matriz extracelular como glicosaminoglicanas e fibronectina, de modo a formar um tecido que lembra em suas características um tecido conjuntivo. O colágeno também é importante, pois possui várias vantagens como a disponibilidade, por ser biodegradável e biorreabsorvível, resistente às forças de distensão e por ter suas propriedades alteradas por modificações de seus grupos funcionais (YOSHIOKA et al., 2008).

Porém, há desvantagens como a degradação rápida, grande hidrofiliabilidade que pode ocasionar inchaço significativo após o implante, uma baixa resistência às forças de compressão e o seu alto custo de purificação. Quando testados quanto ao mimetismo com o tecido epitelial, os polímeros mais positivamente comprovados foram as variações do poli (ácido láctico), o PLLA e o PDLLA que mostram um bom comportamento de células fibroblásticas sobre a membrana tridimensional de PLLA com poros de diferentes diâmetros, além da grande aderência ao polímero, proliferando mais facilmente e produzindo moléculas da matriz extracelular como colágeno e fibronectina (SANTOS JR.; WADA, 2007).

5 Adesão celular

Para que ocorra uma boa interação do polímero-célula, é importante o estabelecimento da adesão celular ao substrato. Os fatores de adesão são componentes biológicos proteicos dos fluidos biológicos e/ou da matriz extracelular adsorvidos na superfície do material, como a fibronectina, a vitronectina e a laminina as quais são reconhecidas pelas integrinas (receptores na membrana celular associados ao citoesqueleto). Essas integrinas se ligam a pequenos domínios nos fatores de adesão como,

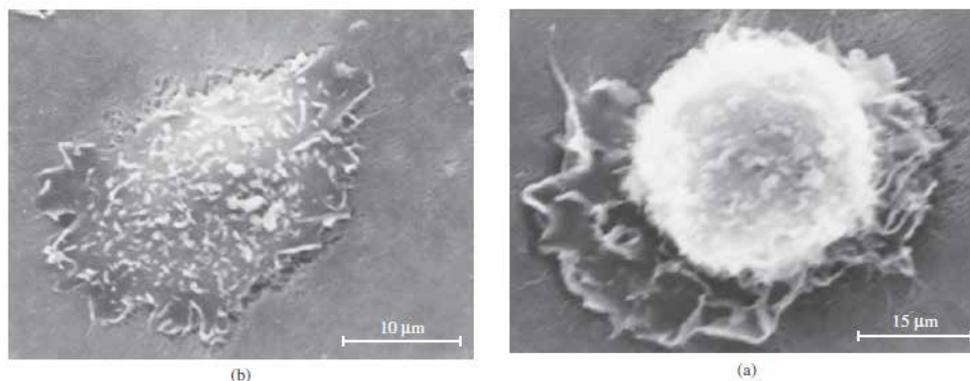
por exemplo, a sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) encontrada na estrutura da fibronectina ou a sequência Tyr-Ile-Gly-Ser-Agn (YIGSR) da estrutura da laminina. O RGD e vários outros oligopeptídeos vêm sendo incorporados aos biomateriais para estimularem adesão e consequente proliferação celular (YAMADA, 1991; SHIN; JO; MIKOS, 2003).

A similaridade físico-química do substrato em relação à matriz extracelular é de fundamental importância, visto que o objetivo é a promoção da diferenciação celular ou proporcionar uma interação mais efetiva do polímero no sítio de ligação do tecido ao qual será implantado. Existe uma grande relação entre a hidrofili- cidade do polímero e a adesão celular, o que tem caracte- rizado a produção de biopolímeros com características físico-químicas e mecânicas mais compatíveis e não so- mente na hidrofili- cidade, como também na disposição de

cargas elétricas, de dureza, de elasticidade e de resistência as mais próximas possíveis às dos tecidos nos quais serão implantados (DEWEZ et al., 1998; NEFF; CALDWELL; TRESKO, 1998).

Posteriormente à adesão, as células iniciam o seu processo de espalhamento, que consiste em um processo complexo que envolve a modificação morfológica celular em consequência das alterações sofridas no citoesqueleto, promovendo assim uma melhor interação com o substra- to (Figura 5). A divisão e a produção de uma nova matriz extracelular também são eventos subsequentes a adesão correta das células ao suporte. A interconexão dos poros e a distribuição uniforme das células são fundamentais para a formação de um tecido na forma de uma rede organi- zada, sendo que *in vivo* tais características são essenciais para a proliferação de vasos, facilitando a nutrição do te- cido ao redor do implante (SANTOS JR; WADA, 2007).

Figura 5 - Com a adesão, as células iniciam sua interação com o substrato. Em: a) se observa o início do fenômeno conhecido como espalhamento (ou espraçamento), que, em virtude das interações com a superfície de crescimento, ocorrem modificações no citoesqueleto e, consequentemente, na morfologia celular, que passa a ser achatada sobre a superfície em que cresce; b) a célula já espalhada sobre o substrato.



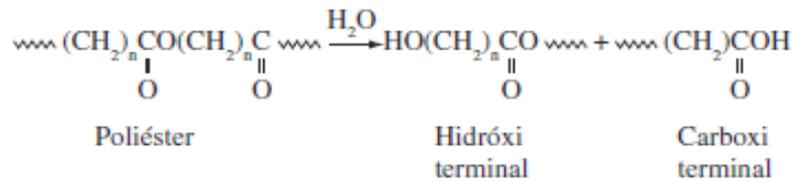
Fonte: Santos Jr e Wada (2007).

6 Metabolismo dos polímeros

O processo de metabolismo do polímero é des- crito na literatura como uma sucessão de eventos e de degradações seguida da biorreabsorção do subproduto, na qual a velocidade de degradação do suporte deve ser proporcional à taxa de produção da matriz extracelular (CANCEDDA et al., 2003). Inicialmente, o composto sofre uma hidratação quando exposto aos fluidos aquosos corpóreos no momento da implantação do suporte. Na

presença das moléculas de água, o processo de degrada- ção inicia-se pela hidrólise das ligações de ésteres (Figura 6), originando subprodutos na forma de oligômeros so- lúveis e não tóxicos. A degradação continua por um pro- cesso biologicamente ativo por enzimas ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo característica a maior perda de massa, a diminuição da massa molar média e a perda das suas propriedades mecânicas como resistência à tração e à compressão (MARTEN; MULLER; DECKWER, 2003).

Figura 6 – Degradação dos polímeros pelo processo de hidrólise.



Fonte: Santos Jr. e Wada (2007).

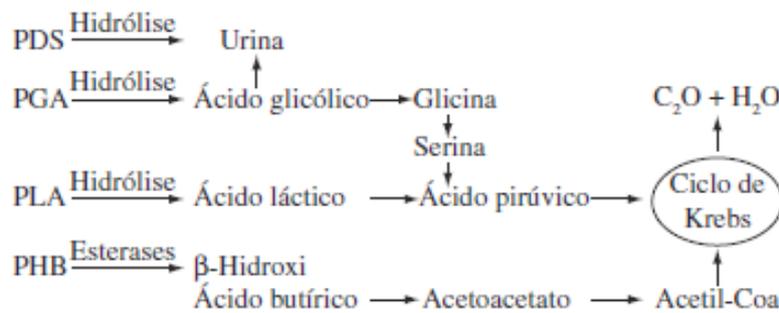
Dentre os muitos subprodutos da hidrólise das ligações de ésteres, a presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. Os produtos existentes na superfície da matriz são difundidos para o meio. Entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos promovendo uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação muito mais acentuada no centro do suporte implantado (LI, 1999)

O processo ativo de biorreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do ciclo do ácido tricarboxílico (Figura 7). Ao final da etapa de hidrólise, segue o processo de oxidação a ácido láctico (para o PLA) e a conversão

das unidades de PGA em glicina que, por sua vez, são convertidas em ácido pirúvico, que na presença da acetil coenzima A, juntamente com a liberação de CO₂, promove a decomposição em citrato. O citrato será então incorporado no ciclo do ácido tricarboxílico, resultando em CO₂ e H₂O, efetivando sua eliminação pela urina e pela respiração. Assim, o material é degradado, absorvido, metabolizado e excretado corretamente pelo organismo (ALI et al., 1993).

Um importante enfoque nas pesquisas atuais deve-se à influência na degradação pela ação de peróxidos, enzimas e células fagocitárias; afinal, não é desejada a promoção de uma resposta inflamatória no sítio de implantação no suporte (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006).

Figura 7 - Via de degradação e excreção de alguns poliésteres, tais como, poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(hidroxitetrato).



Fonte: Santos Jr. e Wada (2007)

Outro fator também influente na degradação dos materiais é a sua composição química, sendo que no caso do poli(ácido láctico), a quiralidade do carbono alfa permite a síntese de compostos enantiômeros, levo (L) e destro (D) rotatórios, dando origem a uma família de polímeros. A cinética de hidrólise do PDLLA tem se

mostrado mais rápida do que a do PLLA. Os demais fatores como a cristalinidade, a porosidade e a geometria do composto, e a localização do implante também influenciam diretamente no tempo de degradação do suporte *in vivo* (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

7 Células-tronco

As células-tronco são a chave para a regeneração e a reparação tecidual, devido à sua capacidade de proliferação e de diferenciação, de sinalização de célula a célula, de produção de biomoléculas e de formação de matriz extracelular (CHAPEKAR, 2000).

Ressalte-se que o recente descobrimento do potencial de diferenciação das células-tronco tem impactado o campo da engenharia tecidual. Depois de estabelecida a adequada adesão celular, o *scaffold* se torna um agente carreador de células no processo que visa à restauração do tecido danificado. E, uma etapa tão fundamental quanto às demais, é a escolha do tipo de células utilizadas como ponto inicial da indução de diferenciação. A medicina regenerativa ou bioengenharia de tecidos vem empregando células-tronco embrionárias ou adultas como forma de implantar, juntamente com o suporte escolhido, células capazes de diferenciação em células específicas do tecido alvo do tratamento. As células-tronco são células indiferenciadas que dão origem a outros tipos, também chamadas de progenitoras.

Há vários tipos de células-tronco:

- 1) Células totipotentes, que são consideradas as células mestre do organismo humano, pois contêm toda a informação genética responsável e hábil para se diferenciar em qualquer outro tipo de célula do corpo incluindo placenta e as membranas embrionárias;
- 2) Células pluripotentes, que são altamente versáteis e que podem se diferenciar de qualquer tipo de célula do corpo humano, exceto a placenta embrionária;
- 3) Células multipotentes, isto é, as células que podem se diferenciar em vários outros tipos celulares, mas em número limitado (YARAK; OKAMOTO, 2010).

A diferença básica quanto ao potencial de diferenciação das células-tronco está na existência de células-tronco embrionárias (totipotentes ou pluripotentes) e células precursoras do organismo já desenvolvidas, chamadas células-tronco adultas ou somáticas (multipotentes) (YARAK; OKAMOTO, 2010).

Há, posteriormente, a escolha quanto à natureza das células a serem utilizadas, que podem ser:

- a) Células autógenas ou autólogas, que são células isoladas do próprio indivíduo;
- b) Células exógenas, que são células de indivíduos diferentes, mas da mesma espécie;
- c) Células xenógenas, que são células de indivíduos de diferentes espécies. A maior dificuldade encontra-se em uma possível rejeição imunológica, já que, ao se expandirem em cultura *in vitro*, quando implantadas por infusão no local de lesão, elas podem promover um reconhecimento como corpo estranho e o organismo, conseqüentemente, inicia um processo inflamatório no local tentando expulsar o agente invasor (ATALA, 2004).

Há então a estratégia de utilização de substâncias que induzam a proliferação e a regeneração celular, sendo que o sucesso desse processo depende da purificação e da produção em larga escala de moléculas sinalizadoras apropriadas, como os fatores de crescimento e os fatores de adesão. Os fatores de crescimento são proteínas altamente específicas fundamentais para a proliferação das células-tronco em vários outros tipos celulares, o que induzirá à formação de um novo tipo de tecido. Estratégias foram criadas para a disponibilização desses fatores de crescimento como a sua liberação lenta utilizando-se de cápsulas poliméricas, estimulando gradualmente a regeneração tecidual. De maior interesse são os implantes autólogos, com técnicas utilizando células sadias provenientes do próprio paciente que serão implantadas no polímero do suporte. As vantagens dessa técnica são muitas, mas se destaca o fato de a população de células isoladas serem em pequeno número, visto que elas são expandidas *in vitro* por meio de cultura celular e também por permitir que se evitem problemas imunológicos como rejeições ou processos alérgicos (SANTOS JR.; WADA, 2007).

8 Modelos de biotecnológicos

Em processo de expansão, trabalhos utilizando os produtos originários da bioengenharia de tecido relatam sucessos, mas há a necessidade de uma ampla pesquisa para melhoramentos dos produtos já existentes e, principalmente, para a fabricação de novos produtos (Tabela 1).

Tabela 1 - Matrizes atualmente disponíveis comercialmente e produtos substitutos dérmicos da bioengenharia tecidual.

Gel de colágeno + cultura alogênica + Queratinócitos humanos + Fibroblastos humanos	Apligraf™	Organogenesis
Cultura de queratinócitos autólogos	Epicell™	Genzyme Biosurgery
Ácido poliglicólico(Dexon™)/ácido polilático (Vicryl™) + matriz de proteínas extracelular	Transcyte™	Advanced Tissue
Colágeno de glicosaminoglicanas – óleo de silicone	Integra™	Integra LifeScience
Derme acelular	AlloDerm™	Lifecell Corporation
Membrana ácido hialurônico microperfurado + cultura de queratinócitos humanos	Laserskin™	Fidia Advanced Biopolymers
Ácido poliglicólico(Dexon™)/ácido polilático (Vicryl™) + Fibroblastos humanos alogênicos	Dermagraft™	Advanced Tissue Sciences
Colágeno + Fibroblatos humanos alogênicos + queratinócitos humanos	Orcel™	Ortec International
Selante de fibrina + cultura autóloga de queratinócitos	Bioseed™	BioTissue Technologies
Óxido de polietileno/Polibutirato + fibroblastos humanos autólogos + Cultura autóloga de queratinócitos	Polyactive™	HC Implants
Membrana ácido hialurônico microperfurado + Fibroblastos humanos	Hyalograft 3D™	Fidia Advanced Biopolymers
Silicone + malha de nylon + colágeno	Biobrane™	Dow Hickham/Bertek Pharmac.

Fonte: Horch et al. (2005).

Dentre os já produzidos, visando à reconstituição da pele, o primeiro lançamento é o Apligraf o qual é indicado para úlceras em pacientes diabéticos sendo produzidos a partir de uma cultura humana de prepúcio de recém-nascido. Esse composto é bilaminar, constituído de uma camada dérmica produzida, utilizando-se de uma cultura de fibroblastos em uma base de colágeno bovino do tipo I. Após sua maturação em um bioreator, a epiderme é formada pela inoculação de queratinócitos, sobre a camada de matriz extracelular produzida pelos fibroblastos dérmicos.

Outro produto similar ao Apligraf e também aprovado pelo FDA, é o OrCel, diferenciando-se apenas pela utilização de células autólogas em sua composição. Produzido por técnicas de estratégia II da engenharia de tecidos, o Dermagraft é um substituto dérmico que utiliza um suporte de PLGA para o cultivo de fibroblastos humanos, também obtidos de prepúcio de recém-nascidos, sendo o material degradado durante a cultura de células, servindo como suporte para a proliferação e para a secreção da matriz extracelular.

Sob o ponto de vista de materiais próprios para a regeneração tecidual cartilaginosa, têm-se o Carticel, aprovado pela FDA, que consiste em uma expansão *in vitro* de culturas de células autólogas de condrócitos.

Este produto é especialmente indicado para pacientes com defeitos cartilagosos sintomáticos causados por traumas de repetição (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Liderados mundialmente pelo grupo de pesquisa do cirurgião Joseph P. Vancanti e o anestesiológico Charles Vancanti, ambos da Universidade de Harvard, as pesquisas de polímeros biorreabsorvíveis para tecido cartilaginoso têm descrito vários estudos sobre a reconstrução de complexas estruturas anatômicas utilizando suportes de PGA e PLA como forma de construção de orelha humana, septo nasal e traqueia. Esses são preparados pelo processo de *fiber bonding*, no qual o suporte é inoculado com condrócitos e inseridos em um biorreator. Os resultados demonstram um novo tecido cartilaginoso, abundante em componentes da matriz extracelular de cartilagem hialina e elástica como o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina e o colágeno do tipo II. Descritos na literatura, quando sob os parâmetros da engenharia tecidual cartilaginosa e epitelial, esses são os produtos já comercializados e relatados com sucesso. Além disso, há uma maciça pesquisa na área de bioengenharia, visando exatamente à obtenção de novos produtos capazes de serem implantados e passíveis de promoverem a regeneração do tecido lesado (HORCH et al., 2005).

9 Considerações finais

Estudos atuais mostram-se capazes de demonstrar e reproduzir com fidelidade os princípios básicos que norteiam a estruturação e o desenvolvimento de suportes baseados em suas estruturas biológicas *in vivo*, tornando-se, então, capazes de construções de suportes tridimensionais hábeis no preenchimento e promoção da regeneração tecidual alvo. Sob o aspecto da utilização, o aproveitamento das características dos biopolímeros já descritos se mostra como um fator fundamental para o avanço de técnicas regenerativas de órgãos e demais tecidos ainda não produzidos.

A busca de novas tecnologias não cessa, visto que o foco cada vez mais se estende para a construção de suportes mais complexos como os que possuam mais de um tipo tecidual em sua composição, visando à regeneração de tecidos mais complexos e órgãos humanos. O sucesso na reconstrução de órgãos exige uma forma multidisciplinar na combinação de técnicas de ciências e engenharia de materiais, medicina e biologia celular e molecular, além de um maior investimento no campo de pesquisas.

Os compostos já existentes provam que suas aplicações não se encontram fora dos parâmetros ideais e promovem uma grande expectativa para o sucesso futuro na reconstrução de órgãos.

Referências

ALI, S. A. M. et al. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices: I. Poly(caprolactone). **Biomaterials**, Amsterdam, v.14, n. 9, p. 648-656, jul. 1993. doi: 10.1016/0142-9612(93)90063-8

ATALA, A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. **Rejuvenation Research**, New York, v. 7, n. 1, p. 15-31, jan. 2004. doi: 10.1089/154916804323105053

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 13-21, jan./mar. 2005. doi: 10.1590/S0104-14282005000100006

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Degradação acelerada de suportes de poli (ϵ -Caprolactona) e poli (D,L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em Meio Alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n. 2, p. 141-148, abr./jun. 2006. doi: 10.1590/S0104-14282006000200015

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 78, Supl. 1, p. 42-46, jan./jun. 2008.

CANCEDDA, R. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 81-91, mar. 2003. doi: 10.1016/S0945-053X(03)00012-X

CARVALHO, A. C. A. et al. Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 9, Supl., p. 20-27, jan./abr. 2010.

CHAN, B. P.; LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 17, Supl. 4, p. S467-S479, dec. 2008. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3

CHAPEKAR, M. S. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, United States, v. 53, n. 6, p. 617-620, nov. 2000. doi: 10.1002/1097-4636(2000)53:6<617:AID-JBM1>3.0.CO;2-C

DEWEZ, J. L. et al. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials**, Amsterdam, v.19, n. 16, p. 1441-1445, aug. 1998. doi: 10.1016/S0142-9612(98)00055-6

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, Amsterdam, v.19, n. 16, p. 1419-1423, aug. 1998. doi: 10.1016/S0142-9612(98)00133-1

HORCH, R. E. et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes. **Journal Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 562-608, jul. 2005. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 21, n. 24, p. 2529-2543, dec. 2000. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6

HUTMACHER, D.W.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 354-362, jul. 2004. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.05.005

JAKAB, K. et al. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 9, p. 2864-2869, mar. 2004. doi: 10.1073/pnas.0400164101

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KAPFER, S. C. et al. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 32, n. 29, p. 6875-6882, out. 2011. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.012.
- KESSEL, R. G. **Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue Engineering. **Science**, Washington, v. 260, n. 5110, p. 920-926, may 1993. doi: 10.1126/science.8493529
- LI, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. **Biomedical Materials Research**, United States, v. 48, n. 3, p. 342-353, may 1999. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:3<342::AID-JBM20>3.0.CO;2-7
- MA, P. X. Biomimetic materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 184-198, jan. 2008. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.041
- MARTEN, E.; MULLER, R. J.; DECKWER, W. D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 80, n. 3, p. 485-501, dec. 2003. doi: 10.1016/S0141-3910(03)00032-6
- NEFF, J. A.; CALDWELL, K. D.; TRESKO, P. A. A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates. **Biomedical Materials Research**, United States, v. 40, n. 4, p. 511-519, jun. 1998. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19980615)40:4<511:AID-JBM1>3.0.CO;2-I
- OLIVEIRA, M. F. et al. Construção de *Scaffolds* para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 373-382, abr./jun. 2007. doi: 10.1590/S1517-70762007000200016
- OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; TOGNOLI, G.K. Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2403-2412, nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800051
- POIRIER, J. et al. **Histologia molecular: atlas e texto**. São Paulo: Santos, 2003.
- SADER, M.; FERREIRA, M.; DIAS, M. L. Preparação e caracterização de estruturas porosas de poli(3-hidroxibutirato). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n. 1, p. 12-18, jan./mar. 2006. doi: 10.1590/S0104-14282006000100006
- SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 17, n. 4, p. 308-317, oct./dec. 2007. doi: 10.1590/S0104-14282007000400010
- SANTOS JR, A. R. et al. Analysis of the growth pattern of Vero Cells cultured on dense and porous poly (L-Lactic Acid) scaffolds. **Materials Research**, São Carlos, v. 12, n. 3, p. 257-263, jul./set. 2009. doi: 10.1590/S1516-14392009000300002
- SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, n. 24, p. 4353-4364, nov. 2003. doi:10.1016/S0142-9612(03)00339-9
- TAKAGI, M. et al. Effect of poly DL-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID MESH ON A THREE-DIMENSIONAL CULTURE OF CHONDROCYTES. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 98, n. 6, p.477-481, nov./dec. 2004. doi: 10.1016/S1389-1723(05)00315-4
- YAMADA, K. M. Adhesive recognition sequences. **The Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 266, n. 20, p. 12809-12812, jul. 1991.
- YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 5, p. 647-656, sep./oct. 2010. doi: 10.1590/S0365-05962010000500008
- YOSHIOKA, S. A. Desenvolvimento de Suportes a Base de Colágeno/Ácido Hialurônico para Engenharia de Tecidos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 21., 2008, Salvador. **Livro de Resumos...** Salvador, 2008.

**Para publicar na revista Universitas:
Ciências da Saúde, acesse o endereço eletrônico
www.publicacoesacademicas.uniceub.br.**

Observe as normas de publicação, para facilitar e agilizar o trabalho de edição.