

ANA RITA CARVALHO ALVES

ENGENHARIA DE TECIDOS — VÁLVULAS CARDÍACAS

MONOGRAFIA

DISSERTAÇÃO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO 2º CICLO DE ESTUDOS DO MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
SETEMBRO DE 2013



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível com a colaboração, contributo e estímulo, direta ou indiretamente, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e reconhecimento, em particular:

ao Professor Doutor Luís Almeida, pela disponibilidade mostrada para a orientação deste trabalho, pela exigência de método e rigor, pela revisão crítica de texto, pelos sábios comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões;

às funcionárias da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra, pelo apoio informático e de pesquisa que me concederam;

aos meus amigos e colegas, que de alguma forma mostraram interesse por este trabalho, dando o seu contributo com amizade e espírito de entajuda;

e por último, mas não menos importante, aos meus familiares, pais e irmã, e namorado, pela compreensão, pelos sacrifícios e pelo estímulo e encorajamento a fim de prosseguir e concluir este trabalho.

A todos reitero votos de eterna gratidão e reconhecimento.

“O rio atinge seus objetivos porque
aprendeu a contornar seus obstáculos”

Lao Tse

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	8
RESUMO	9
- PALAVRAS-CHAVE:	9
ABSTRACT	10
- KEY-WORDS	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 VÁLVULAS CARDÍACAS.....	11
1.1.1. Válvulas mecânicas	13
1.1.2. Válvulas biológicas.....	15
2. ENGENHARIA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DAS VÁLVULAS	
CARDÍACAS	18
2.1. SCAFFOLDS.....	19
2.1.1. Tecidos xenogénicos acelulares.....	22
2.1.2. Biomateriais	23
2.1.1.1. Biomateriais naturais	23
2.1.1.2. Biomateriais sintéticos	27
2.2. CONCEÇÃO DE ESTRUTURAS	29
3. CÉLULAS ESTAMINAIS E REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS.....	31
3.1. CÉLULAS ESTAMINAIS EM REGENERAÇÃO DE VÁLVULAS CARDÍACAS.....	32
4. CASOS CLÍNICOS.....	35
4.1) FOLHETOS VALVULARES CARDÍACOS DESCELULARIZADOS COM POTENCIAL DE RECELULARIZAÇÃO.....	35
4.2) VÁLVULAS CARDÍACAS HUMANAS USANDO CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DO CORDÃO UMBILICAL	35
4.3) CÉLULAS ESTAMINAIS ADMINISTRADAS POR CATETER – IMPLANTAÇÃO DE VÁLVULA AÓRTICA.....	36
5. CONCLUSÃO	39
ANEXOS.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – (A) Estenose: patologia na válvula definida como uma abertura incompleta da mesma, dificultando a passagem do fluxo de sangue, Pode ser congênita ou adquirida; (B) Regurgitação: também conhecida por insuficiência valvular, com ocorrência de escoamento anormal do sangue. A válvula não encerra totalmente, pelo que o sangue volta para trás (in [2])..... 12
- Figura 2** - Representação esquemática do coração e suas válvulas cardíacas. A separar a aurícula esquerda do ventrículo esquerdo e a aurícula direita do ventrículo direito, encontram-se as válvulas mitral e tricúspide, respetivamente. A válvula pulmonar é a que separa o ventrículo direito da artéria pulmonar. Aberta, em ciclo cardíaco, permite o fluxo de sangue do ventrículo para a circulação pulmonar, quando o ventrículo se encontra relaxado, a válvula fecha impedindo refluxo do sangue. A válvula aórtica separa o ventrículo esquerdo da artéria aorta. Quando aberta no ciclo cardíaco, permite a passagem do sangue do ventrículo para a circulação sistémica, na diástole cardíaca ela fecha e impede, mais uma vez, o refluxo de sangue (in [5]; in [6])..... 13
- Figura 3** – *Caged-ball* – válvula desenhada pelo cirurgião Dr Charles A. Hufnagel. Dispositivo implantado, em 1952, na aorta, sem necessidade de circulação extracorporal. Implantada para o combate de insuficiência aórtica grave, com redução parcial dos sintomas (in [7]).... 14
- Figura 4** – Válvulas cardíacas mecânicas: (A) válvula de esfera enjaulada ou *caged-ball*, primeira válvula cardíaca desenhada e implantada pelo cirurgião Charles Hufnagel; (B) válvula de disco inclinado ou *tilting-disk*, modelo criado para reduzir o fluxo de sangue perdido com uso de válvulas de esfera; e (C) válvula de dois folhetos semicirculares ou *bileaflet.*, com redução de danos e fluxo de sangue melhorado, pois a abertura completa dos folhetos reduz a resistência ao fluxo sanguíneo (in [8])..... 15
- Figura 5** – (A) Válvula de suíno: pele de porco tratada através de várias etapas, que variam de acordo com o seu uso ou método de conservação. A pele é posta em contacto com aldeídos de forma a “iludir” o sistema imunológico, para melhor tolerância do indivíduo. (B) Válvula pericárdica de bovino: tecido de bovino preservado em glutaraldeído, para uso cirúrgico de danos valvulares. (C) Aloenxerto/homoenxerto de válvula aórtica humana: tecido de indivíduo geneticamente diferente do doente (Fonte: Adaptado de Vesely, 2005) 15
- Figura 6** – Esquema das múltiplas camadas de uma válvula cardíaca. A válvula é revestida por endotélio, bastante resistente, alinhado perpendicularmente e que protege a válvula de danos, bem como de reações imunes e degeneração. Ventriculares é uma camada constituída por fibras densas de elastina (cedem bem à tração recuperando rapidamente a forma original). Internamente encontra-se uma camada esponjosa, constituída fundamentalmente por glicosaminoglicanos e algum colagénio, esta camada forma aquilo que se designa por *scaffold* ou matriz estrutural. Por fim, a camada fibrosa é um tecido essencialmente constituído por colagénio (Fonte: Adaptado de Radoslaw *et.al*, 2012). 18
- Figura 7** – A interação *scaffold*-células leva à adesão celular e posterior organização espacial do conjunto de células; de seguida pode ocorrer proliferação, expressão génica, motilidade

ou diferenciação celular com posterior reconstrução do tecido. (Fonte: Adaptado de Li *et.al*, 2001)..... 21

Figura 8 – Estrutura tridimensional e parâmetros da estrutura de *scaffold* constituída por Policaprolactona (PCL), com fins de investigação em engenharia de tecidos. Os poros desta estrutura são 100% abertos e interligados, facilitando a adesão das células, a troca de nutrientes e dos resíduos do metabolismo (in [9])..... 29

Figura 9 – As células estaminais renovam-se por um processo de divisão contínua, durante longos períodos de tempo, ou seja, indefinidamente, (A) Células Estaminais Embrionárias – células que existem numa fase inicial do desenvolvimento do embrião humano, o blastocisto, antes da introdução nas paredes do útero. São células pluripotentes, isto é, têm a capacidade de se diferenciarem em qualquer tipo de tecidos ou órgãos do organismo. (B) Células Estaminais Adultas – são células mais especializadas que as embrionárias. Estas células são obtidas após o nascimento, não são diferenciadas e podem encontrar-se em diferentes partes do nosso organismo, isto é, em tecidos especializados e diferenciados, Têm ainda a capacidade de se auto-renovarem ao longo de toda a vida do organismo – multipotentes. (in [10])..... 32

Figura 10 – (A) Diferentes origens das células estaminais: de tecido adulto, de fetos e de células induzidas por reprogramação de células diferenciadas. (B) Recolhidas células de um doente, com posterior introdução das mesmas *in vitro* para a obtenção de válvulas cardíacas através da engenharia de tecidos - Inicialmente ocorre isolamento das CE's colhidas de tecido adulto, com posterior expansão das mesmas em cultura de células. Depois de obtidas as células e escolhida a *scaffold* adequada, ocorre o processo de cultivo. Através de diversas condições dinâmicas num bioreator são obtidas as válvulas cardíacas desejadas. (Fonte: Adaptado de Weber *et.al*, 2012). 34

Figura 11 – Engenharia de tecidos para o fabrico de válvula cardíaca humana – Inicialmente efetuada ecocardiografia fetal de diagnóstico cardíaco com defeitos congénitos. Devido aos resultados do diagnóstico células da parede vascular do cordão umbilical são colhidas, isoladas, expandidas *in vitro* e criopreservadas em bancos de células. Na altura ideal para cirurgia, as células criopreservadas são descongeladas e recultivadas numa *scaffold* biodegradável, com características de válvula cardíaca. Num bioreator há construção celular (sistema de cultura de células com características dinâmicas) e crescimento *in vitro*. Depois da maturação no bioreator, a válvula cardíaca proveniente da engenharia de tecidos é implantada no mesmo doente (Fonte: Adaptado de Sodian *et.al*, 2006) 36

Figura 12 – Células estaminais transportadas em cateter, para a posição da válvula aórtica. (1) A medula óssea é aspirada do esterno para uma seringa com heparina, (2) posteriormente as células mononucleares, da medula, são obtidas por centrifugação (3) e cultivadas numa *scaffold* de fibrina acoplada a um *stent* de válvula cardíaca. (4) Quando o cateter atinge o ponto alvo, sofre dilatação libertando o dispositivo. A duração deste processo, desde a colheita das células até à sua implantação, demora cerca de 2h. (Adaptado de: Emmert *et.al*, 2013)..... 37

Figura 13 – Distribuição dos animais em estudo por grupos, de acordo com o tempo de acompanhamento. No grupo A todos os animais foram seguidos devidamente, já no grupo B,

só 3 dos 5 terminaram o acompanhamento. Por fim, no grupo D, um deles terminou ao fim de 1 semana e outro ao fim de 2 semanas (Adaptado de Emmert <i>et.al</i> , 2013).	37
Figura 14 – Dados Europeus da colheita de tecidos de 2010. Portugal está abaixo das médias europeias no que toca à colheita de tecidos, sendo o país com menos colheita de válvulas cardíacas (in [13]).....	40
Figura 15 - Evolução da Transplantação cardíaca em Portuga. A transplantação cardíaca em Portugal aumentou 6,4% em 2010, com um total de 558 transplantes cardíacos (in [13]). ...	40
Figura 16 – Células Estaminais Embrionárias, Adultas e Pluripotentes Induzidas – Origem e obtenção das células estaminais. Células estaminais embrionárias obtidas através de fertilização ou clonagem, com a formação de embrião. Células estaminais adultas obtidas de tecidos adultos (diferenciados). E células pluripotentes induzidas (iPSC) obtidas a partir de células diferenciadas com adição de genes e produtos químicos, levando-as a ter comportamento de células estaminais embrionárias [14].	41
Figura 17 – Fonte de células estaminais embrionárias e adultas. Após a fecundação, as células da massa celular do blastocisto pré-implantado podem ser isoladas e cultivadas <i>in vitro</i> , dando origem a células estaminais embrionárias com capacidade de se auto-renovarem (células pluripotentes). Após implantação, células isoladas de blastocisto (células estaminais de epiblasto) são igualmente pluripotentes podendo dar origem a células de 3 camadas germinativas, apesar de terem capacidade restrita de diferenciação, em relação às CEE. A partir do embrião podem obter-se células germinais, também pluripotentes, e ainda células estaminais do cordão umbilical, hematopoiéticas e mesenquimais. Vários tecidos do organismo adulto contêm células imaturas (células estaminais adultas ou somáticas) que permitem a reposição das células perdidas por morte natural do tecido ou lesão. (Fonte: Adaptado de Bragança <i>et.al</i> , 2010)	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros estruturais das <i>scaffolds</i> para aplicação na engenharia de tecidos. (Fonte: Adaptado de Edwards <i>et.al</i> , 2004).....	20
Tabela 2 – Características, desvantagens e vantagens dos polímeros naturais mais comuns na medicina. (Fonte: Assis <i>et.al</i> , 2003; Dasi <i>et.al</i> , 2009; Filová <i>et.al</i> , 2009; Kim <i>et.al</i> , 2011);....	24
Tabela 3 – Polímeros sintéticos com capacidade biodegradável e suas características. (Fonte: Junior <i>et.al</i> , 2007; Kim <i>et.al</i> , 2011; Mol <i>et.al</i> , 2009; Rosa <i>et.al</i> , 2000).	28
Tabela 4 – Requisitos essenciais ao desenho de válvulas cardíacas (Fonte: Adaptado de Ghanbari <i>et.al</i> , 2009).....	30
Tabela 5 – Células estaminais e sua origem, vantagens e desvantagens das mesmas na reparação cardíaca. (Foles <i>et.al</i> , 2011; Hansson <i>et.al</i> , 2009; Radoslaw <i>et.al</i> , 2012; in [10]; in [11]).....	33

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

3D – Tridimensional

A

AH – Ácido Hialurónico

C

CE – Células estaminal

CEA – Células estaminal adulta

CEE – Células estaminal embrionária

CEM – Célula estaminal mesenquimal

CU – Cordão umbilical

D

DOA – Ácido deoxicólico

F

FDA – *Food and Drug Administration*

I

iPSC – Células estamimais pluripotentes induzidas

M

MEC – Matriz Extracelular

P

PCL – Policaprolactona

PEG – Polietilenoglicol

PGA – Ácido Poliglicólico

PHB – Polihidroxibutirato

PLA – Ácido Poliláctico

PLGA – Ácido poliláctico-co-glicólico

S

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SID – Submucosa do intestino delgado

V

VC – Válvula cardíaca

VCET – Válvulas cardíacas derivadas da Engenharia de Tecidos

RESUMO

As doenças cardiovasculares são uma fonte de preocupação dado que são responsáveis por cerca de 30% da mortalidade a nível global. Uma das causas para esta tão elevada percentagem é a disfunção das válvulas cardíacas (aórtica, pulmonar, mitral e tricúspide).

O funcionamento fisiológico normal das válvulas cardíacas é responsável pela unidirecionalidade do fluxo de sangue através das suas cavidades (aurículas e ventrículos) e dos principais vasos para uma abertura e fechamento regulares ao longo de cada ciclo cardíaco.

A solução mais comum para este tipo de doenças cardíacas baseia-se na reparação ou substituição das válvulas danificadas. A substituição é fundamentalmente feita através do uso de válvulas de origem mecânica (constituídas por metal) e origem biológica (dadores animais), ou ainda provenientes de dadores humanos (aloenxertos). Estas nem sempre apresentam vantagens, pois levam os doentes a necessitar de tratamento anticoagulante para o resto da vida (as mecânicas) e elevada possibilidade de reoperação (as biológicas). Devido às imperfeições do uso de próteses e limitações na obtenção das mesmas, a utilização da engenharia de tecidos e em particular de células estaminais tem vindo a ganhar terreno como estratégia para desenvolvimento de válvulas cardíacas.

A engenharia de tecidos pretende mimetizar a válvula nativa, permitindo em teoria a construção de novas válvulas com capacidade para ultrapassar as limitações existentes atualmente, através da possível criação de uma válvula autóloga que previna a resposta imunológica e promova o crescimento, remodelação e reparação *in vivo*.

Para esse efeito recorre-se à utilização de *scaffolds*, pois fornecem o suporte necessário para que as células se fixem, proliferem e mantenham a sua função diferencial. Uma variada gama de polímeros naturais (ex: colagénio, alginato, fibrina) e sintéticos (ex: PEG, PLA, PGA) está hoje à disponibilidade desta engenharia, para poder obter *scaffolds* adequadas aos doentes. As células têm assim a capacidade de expandir graças à estrutura tridimensional e porosa do suporte sintético ou natural. A *scaffold* precisa de mimetizar o mais possível a matriz extracelular, de forma a não ocorrer resposta imunológica.

Em *scaffolds* vão-se colocar células, destacando-se a promessa das células estaminais (embrionárias e adultas), assim como mais recentemente de células estaminais pluripotentes induzidas, obtidas por reprogramação de células somáticas diferenciadas.

Este tipo de células é vantajoso, porque evitam o sacrifício das estruturas vasculares dos doentes sujeitos a cirurgia. Estas células após diferenciação devem permitir a obtenção de células com características cardiológicas.

Com o uso destas células na engenharia de tecidos, principalmente nas válvulas cardíacas, espera-se poder combater as desvantagens inerentes às próteses valvulares, evitando de alguma forma respostas imunológicas, tratamentos para o resto da vida e necessidade de reoperação.

- **PALAVRAS-CHAVE:** cardiovascular; válvulas cardíacas; engenharia de tecidos; *scaffolds*; polímeros naturais e sintéticos; células estaminais; reprogramação de tecidos

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a source of concern because they are responsible for about 30% of all deaths worldwide. One of the reasons for this high percentage is dysfunction of the cardiac valves (aortic, pulmonary, mitral and tricuspid).

The normal physiological function of the cardiac valves is to ensure unidirectional blood flow through the cardiac cavities (atria and ventricles) and the main vessels achieved through specifically timed opening and closing during each cardiac cycle.

The most common solution for valvular diseases is based on the repair or replacement of damaged valves. Valve replacement is achieved through the use of mechanical valves (made from metallic material) and biological valves (derived from animal donors) or from human donors (allografts). However, current mechanical valves all require lifelong treatment with anticoagulants and biological valves present high possibility of reoperation. Due to imperfections and limitations of prosthetic valves, the tissue engineering and the use of stem cells have been gaining importance to the development of cardiac valves.

Tissue engineering aims to mimic the native valve with the target of building new valves with the capacity to overcome the current limitations, through the possible creation of an autologous valve that prevents the immune response and promotes growth, remodeling and repair in vivo.

For this purpose scaffolds are an option for this problem as they provide the needed support structures so that the cells can attach, proliferate and maintain their differential function. There is nowadays a wide range of natural polymers (eg. collagen, alginate, fibrin) and synthetic polymers (eg. PEG, PLA, PGA) in order to obtain scaffolds suitable for patients. Thus, the cells have the capacity to expand due to their three-dimensional structure and porous natural or synthetic support. Scaffolds have to mimic the extracellular matrix as much as possible so that immune response does not occur.

Cells will be placed in scaffolds, highlighting the promise of stem cells (embryonic and adult), as well as more recently induced pluripotent stem cells obtained by reprogramming of differentiated somatic cells.

Stem cells have advantages because they avoid the sacrifice of the vascular structures of patients undergoing surgery and they are capable of differentiating into several cells with cardiac features.

Using these kind of cells, mainly in cardiac valves, tissue engineering may be able to combat the disadvantages of prosthetic valves, avoiding immune responses, treatments for the rest of life and need for reoperation.

- **KEY-WORDS:** cardiovascular; cardiac valves; tissue engineering; scaffolds; natural and synthetic polymers, stem cells; reprogramming of tissues.

I. INTRODUÇÃO

O coração é um órgão muscular que bombeia o sangue para todo o corpo. As contrações do coração necessárias para conduzir o sangue são controladas por impulsos eletroquímicos criados pelas chamadas células *pacemaker*. São estas que asseguram as contrações rítmicas sincronizadas de todos os músculos cardíacos. Desta forma, as válvulas cardíacas (VC) são a chave para o bom funcionamento do coração, enquanto bomba muscular (Dasi *et.al*, 2009).

Nos últimos anos, tem-se vindo a identificar um número cada vez maior de casos de doentes com disfunções no que toca ao bom funcionamento das VC. Deste modo, a medicina tem procurado incorporar os recentes avanços científicos e tecnológicos de forma a avaliar estas patologias. Uma das soluções atuais é o uso de próteses de natureza mecânica ou biológica. Dadas as limitações deste tipo de próteses espera-se que as células estaminais e a engenharia de tecidos, permitam encontrar novas soluções, soluções estas que se esperam mais eficazes e que de alguma forma mimetizem o melhor possível os tecidos nativos dos respetivos doentes.

As doenças do sistema cardiovascular são cada vez mais um “atentado” à saúde humana, com os maus hábitos dos dias de hoje a serem a causa mais apontada para este problema. Com tudo isto, aparece uma oportunidade de mercado, onde clínicos e investigadores encontram uma série de pontos de interesse para o desenvolvimento de novos tipos de VC’s, que possam de alguma forma revolucionar a indústria e a prática da medicina (Vesely, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela morte de cerca de 17.3 milhões de pessoas em 2008, as quais representam cerca de 30% da mortalidade a nível global [1].

As válvulas cardíacas frequentemente usadas (mecânicas e biológicas) apresentam algumas desvantagens. As primeiras são constituídas essencialmente por carbono e componentes metálicos e poliméricos, levando assim á necessidade de tratamento anticoagulante, de forma permanente por parte dos doentes. As válvulas biológicas têm origem em tecidos animais (bovino, suíno), levando a complicações na cirurgia e riscos de reoperação. Justifica-se, deste modo, a possibilidade de construção de VC’s bioartificiais, com recurso tanto a componentes biológicos autólogos como a métodos da engenharia de tecidos (Filová *et.al*, 2009), bem como, ao uso de válvulas obtidas através da reprogramação de células estaminais.

I.1 VÁLVULAS CARDÍACAS

As doenças das válvulas cardíacas representam um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial, elevando assim as estatísticas de mortalidade. Em países subdesenvolvidos, estas doenças afetam principalmente crianças e jovens. Pelo contrário em países mais desenvolvidos, as disfunções nas válvulas são frequentemente diagnosticadas em pessoas de idade mais avançada, sendo assim reconhecida como uma patologia degenerativa (Mol *et.al*,

2009). Estas doenças comprometem o bom funcionamento das válvulas ao restringir o movimento dos seus folhetos (*leaflets*) ou por danificarem a sua estrutura de apoio. Aumenta assim a possibilidade de ocorrer falha no funcionamento normal das válvulas, quer por estenose ou por regurgitação. Na estenose ocorre calcificação dos folhetos com conseqüente estreitamento da válvula, resultando numa maior resistência ao fluxo de sangue; já na regurgitação ocorre o fluxo inverso do sangue (Dasi *et.al*, 2009), como se observa na figura 1.

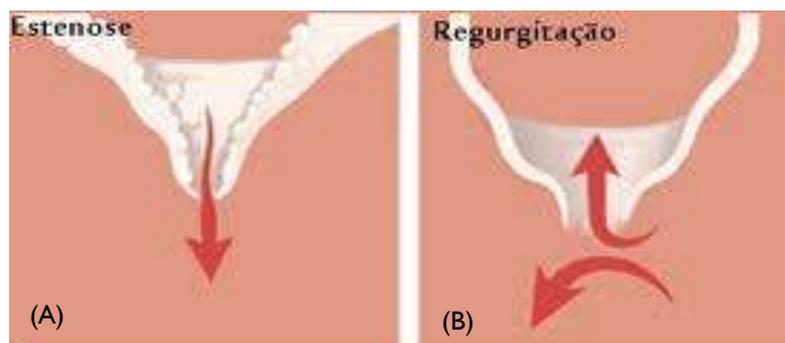


Figura 1 – (A) Estenose: patologia na válvula definida como uma abertura incompleta da mesma, dificultando a passagem do fluxo de sangue, Pode ser congênita ou adquirida; (B) Regurgitação: também conhecida por insuficiência valvular, com ocorrência de escoamento anormal do sangue. A válvula não encerra totalmente, pelo que o sangue volta para trás (in [2]).

A cirurgia das válvulas cardíacas é uma cirurgia de “tórax aberto”, que é realizada com o uso de anestesia geral. A cirurgia é realizada pela abertura do tórax, onde o sangue é desviado do coração para uma máquina que oxigena e mantém o sangue do doente em circulação [3].

Sendo esta cirurgia de notória dificuldade, surgem questões como: “Quais os benefícios?”, “Quais os riscos?”, “Qual o tempo de recuperação?”, “Qual a possibilidade de toma de medicação após cirurgia?”. As respostas aparecem e nem sempre são as mais favoráveis, mas no que toca aos benefícios, muitos doentes depois de operação verificam melhoras nos sintomas e na qualidade de vida (cerca de 95 em 100 doentes sujeitos a cirurgia às VC’s têm uma operação bem sucedida). No que toca aos riscos, sabe-se que qualquer tipo de cirurgia acarreta certos cuidados, sendo a idade, o estado de saúde do doente e o grau de deficiência da válvula, alguns dos riscos a ter em atenção. Depois da cirurgia, em média, grande parte dos doentes regressa a casa ao fim de uma semana e leva 2 a 3 meses a recuperar totalmente, dependendo da condição pessoal de cada indivíduo. Relativamente à medicação, pode variar consoante o tipo de prótese implantada, pois a sua durabilidade varia dependendo da sua origem [4].

As válvulas cardíacas são quatro (Figura 2): a aórtica, pulmonar, mitral e tricúspide, duas de cada lado do coração, assegurando que a contração muscular produz fluxo eficiente e unidirecional (Dasi *et.al*, 2009).

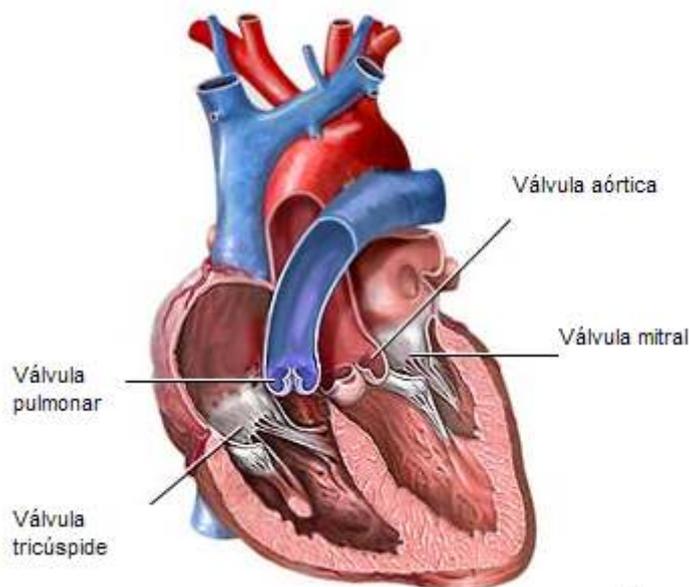


Figura 2 - Representação esquemática do coração e suas válvulas cardíacas. A separar a aurícula esquerda do ventrículo esquerdo e a aurícula direita do ventrículo direito, encontram-se as válvulas mitral e tricúspide, respetivamente. A válvula pulmonar é a que separa o ventrículo direito da artéria pulmonar. Aberta, em ciclo cardíaco, permite o fluxo de sangue do ventrículo para a circulação pulmonar, quando o ventrículo se encontra relaxado, a válvula fecha impedindo refluxo do sangue. A válvula aórtica separa o ventrículo esquerdo da artéria aorta. Quando aberta no ciclo cardíaco, permite a passagem do sangue do ventrículo para a circulação sistêmica, na diástole cardíaca ela fecha e impede, mais uma vez, o refluxo de sangue (in [5]; in [6]).

Para o tratamento cirúrgico da válvula aórtica (válvula que separa a aorta do ventrículo esquerdo) a abordagem atualmente preferida recai essencialmente na sua substituição. Já nas válvulas mitral e tricúspide (separação entre a aurícula esquerda e o ventrículo esquerdo, e entre a aurícula direita e o ventrículo direito, respetivamente), no caso de se estar perante um doente adulto, opta-se preferencialmente por conservar as válvulas nativas. No que toca às válvulas tricúspide e pulmonar, os casos diagnosticados em adultos são pouco frequentes, exceto raras exceções. Apesar das diferentes abordagens no que toca à cirurgia destas quatro válvulas, há casos clínicos em que acabou por ocorrer substituição da nativa por uma prótese (Filová *et.al*, 2009), pois esta depende da natureza e progressão da patologia, bem como de fatores pessoais, idade e comorbidade (Mol *et.al*, 2009).

As tradicionais próteses para a substituição das válvulas patológicas têm origem mecânica ou biológica. Estas diferem significativamente entre si, quer a nível de constituição, durabilidade e de complicações posteriores à cirurgia.

1.1.1. VÁLVULAS MECÂNICAS

As próteses de origem mecânica são fundamentalmente constituídas por carbono pirolítico combinado com componentes metálicos e poliméricos. Estes dispositivos apresentam riscos para o doente, aumentando a possibilidade de inflamação com posterior trombose (Sewell-Loftin *et.al*, 2011), complicações tromboembólicas devido a uma elevada tensão tangencial (Mol *et.al*, 2009), endocardite que ocorre predominantemente na superfície do material estranho (Filová *et.al*, 2009) e a frequente necessidade de realizar terapia

anticoagulante, que leva assim a complicações hemorrágicas (Mol *et.al*, 2009). Ainda assim, a nível de durabilidade, é viável a longo prazo para o doente (cerca de 20 anos) (Sewell-Loftin *et al*, 2011), sendo desta forma indicadas para doentes jovens cujo esforço se prevê que seja maior que em doentes de idade mais avançada.

Depois da substituição da primeira VC, no ano de 1952 por Charles Hufnagel (Figura 3), mais de 50 modelos de próteses já foram desenvolvidos e cerca de 3 milhões foram implantadas em todo o mundo (Dasi *et.al*, 2009).



Figura 3 – *Caged-ball* – válvula desenhada pelo cirurgião Dr Charles A. Hufnagel. Dispositivo implantado, em 1952, na aorta, sem necessidade de circulação extracorporeal. Implantada para o combate de insuficiência aórtica grave, com redução parcial dos sintomas (in [7]).

Existem atualmente três tipos principais de válvulas mecânicas, são elas as válvulas *caged-ball*, válvulas *tilting-disk* e válvulas *bileaflet* (Figura 4). Como já referido, a primeira válvula substituída foi em 1952 por Hufnagel, tendo sido uma válvula *caged-ball*. O procedimento baseou-se na contração do coração, e quando a pressão do sangue dentro do coração excedeu a pressão fora, a bola entrou para a “jaula” e permitiu o fluxo de sangue. Após a contração do coração, a pressão dentro deste diminuiu, possibilitando o movimento da bola para trás contra a base da válvula, formando uma vedação (Filová *et.al*, 2009).

A válvula *caged-ball*, de Hufnagel, tornou-se obsoleta após a introdução da invenção de Starr-Edwards, em 1962, que consiste numa bola de silicone enclausurada numa “jaula” metálica, bola esta que vai tapar o orifício da válvula impedindo o refluxo de sangue (Filová *et.al*, 2009; Dasi *et.al*, 2009).

Foram desenvolvidas outras válvulas artificiais, focando-se na alteração quer dos materiais quer das técnicas de construção. Deste modo, apareceram de seguida as válvulas *tilting-disk*, nos anos de 1969-1970, a partir de Bjork-Shiley e Lillehei-Kaster. Estas válvulas são constituídas por um disco e um mecanismo de suporte, tendo o disco forma de anel e na sua constituição carbono pirolítico, coberto de politetrafluoroetileno (ePTFE). Através dos mecanismos de suporte, o disco fecha tapando o orifício da válvula e inclinam de modo a permitir a passagem do sangue, mimetizando o natural funcionamento da válvula nativa (Dasi *et.al*, 2009; Filová *et.al*, 2009; Sewell-Loftin *et.al*, 2011).

O mais recente desenho de válvulas mecânicas foi introduzido no mercado, pela St. Jude Medical Company, em 1978-1979, com o desenvolvimento das válvulas *bileaflets*. Estas válvulas são constituídas por dois semicírculos ou folhetos, que rodam em torno de suportes

que se ligam á válvula de suporte (Filová *et.al*, 2009; Gott *et.al*, 2003). Cada folheto tem uma região de extensão. Quando estes se encontram abertos, o sangue flui através de um orifício retangular e dois orifícios semicirculares laterais, quando se encontram fechados, pequenos espaços entre os folhetos e o suporte dos mesmos permitem a passagem de um algum fluxo de sangue. O mecanismo de duplo folheto (*bileaflet*) é atualmente o mais popular, ocorrendo aproximadamente 80% de implantes com este tipo de válvulas (Dasi *et.al*, 2009).



Figura 4 – Válvulas cardíacas mecânicas: (A) válvula de esfera enjaulada ou *caged-ball*, primeira válvula cardíaca desenhada e implantada pelo cirurgião Charles Hufnagel; (B) válvula de disco inclinado ou *tilting-disk*, modelo criado para reduzir o fluxo de sangue perdido com uso de válvulas de esfera; e (C) válvula de dois folhetos semicirculares ou *bileaflet*., com redução de danos e fluxo de sangue melhorado, pois a abertura completa dos folhetos reduz a resistência ao fluxo sanguíneo (in [8]).

1.1.2. VÁLVULAS BIOLÓGICAS

De forma a contornar problemas provenientes do implante de válvulas mecânicas, como a terapia anticoagulante ao longo da vida do doente, e a possibilidade de hemorragias, surgiu uma alternativa: o uso de válvulas cardíacas com origem biológica.

Em meados de 1969, Carpentier avançou neste estudo com o desenvolvimento de tecido coberto com glutaraldeído, que permitiu um aumento da estabilidade do tecido biológico e uma diminuição na biodegradação, conduzindo a um melhoramento na preservação do mesmo (Dasi *et.al*, 2009; Filová *et.al*, 2009).

Na Figura 5 encontram-se os tipos de próteses biológicas atualmente disponíveis – válvulas de suíno e válvulas pericárdicas de bovino – e aloenxertos/autoenxertos (Vesely, 2005).

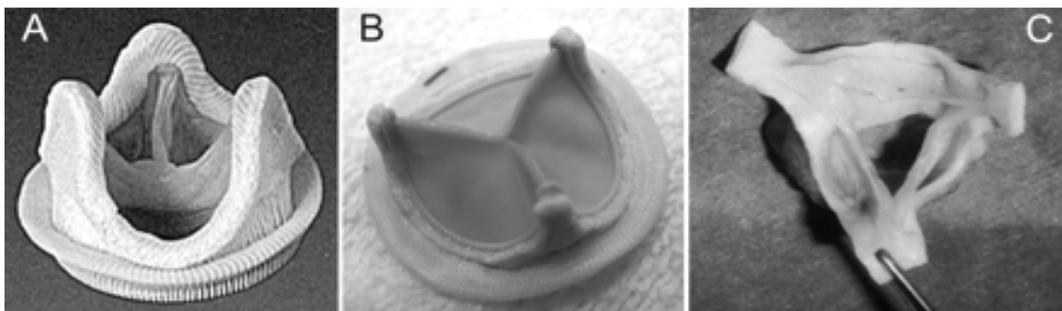


Figura 5 – (A) Válvula de suíno: pele de porco tratada através de várias etapas, que variam de acordo com o seu uso ou método de conservação. A pele é posta em contacto com aldeídos de forma a “iludir” o sistema imunológico, para melhor tolerância do indivíduo. (B) Válvula pericárdica de bovino: tecido de bovino preservado em glutaraldeído, para uso cirúrgico de danos valvulares. (C) Aloenxerto/homoenxerto de válvula aórtica humana: tecido de indivíduo geneticamente diferente do doente (Fonte: Adaptado de Vesely, 2005)

De um modo geral, as próteses de origem animal (suíno e bovino) são tratadas com baixas concentrações de glutaraldeído para reduzir a antigenicidade e estabilizar o tecido contra a degradação proteolítica que pode ocorrer aquando da implantação. Estas mesmas próteses sofrem descélularização através de variadas técnicas e são também tratadas com vários outros agentes químicos para minimizar a possibilidade de calcificar durante o implante e promover uma maior longevidade. Apesar de tudo isto, poderão ocorrer falhas mecânicas e até mesmo calcificação, tornando-se o uso de válvulas biológicas preferencialmente recomendado para doentes com idades superiores a 65 anos, visto que as pessoas que recebem este tipo de próteses necessitam frequentemente de reoperação ao fim de 10-15 anos (Sewell-Lftin *et.al*, 2011; Vesely, 2005).

Tanto os xenoenxertos (suíno e bovino) como os aloenxertos (enxertos de dadores humanos) podem levar à produção de tecido fibrótico, liderando a disfunção das válvulas com incidências de 2-4% de doentes/ano, aumentando assim os valores de trombozes por doente. Estas válvulas protésicas levam à necessidade de nova cirurgia cerca de 15 anos após a implantação. O aumento das idades do aloenxerto dador e do doente recetor tem vindo a ser associado com as falhas do aloenxerto implantado e com a respetiva reoperação, devido à degeneração acelerada que ocorre na válvula, pois esta toma um percurso normal de definhamento, tal como a válvula nativa. O facto de a degeneração depender da idade, deve-se a fatores tais como resposta imunológica ou revestimento progressivo do aloenxerto pelo tecido fibrótico do doente (Filová *et.al*, 2009).

Como curiosidade, relativamente à história das válvulas do pericárdio, o primeiro sucesso de implantação percutâneo num doente, isto é, através de cateterismo cardíaco, ocorreu em 2002, por Cribier, envolvendo uma válvula constituída por 3 folhetos pericárdicos de bovino, colocada dentro de uma espécie de balão, em aço inoxidável, que insufla contra a válvula nativa. A prótese biológica com origem em tecido cardíaco do pericárdio foi implantada na posição aórtica (Cribier *et.al*, 2002).

Os autoenxertos pulmonares mostraram ser os mais resistentes à degeneração, a longo-prazo, bem como os mais adequados para crianças na fase de crescimento. Podem ser usados para substituição da raiz da aorta e de todo o tecido infetado na endocardite da válvula aórtica. Uma outra vantagem do uso de autoenxertos, em indivíduos adultos, é a possibilidade de o enxerto poder ser mais duradouro que o próprio doente (Filová *et.al*, 2009). Por outro lado, esta técnica implica uma cirurgia complexa e exigente (*Ross operation*), pois envolve o uso de duas válvulas e manipulações extensas da raiz da aorta, e ainda a disponibilidade de aloenxertos não se encontrando ainda disponíveis resultados a longo prazo (Fragata *et.al*, 2004). A operação de Ross consiste essencialmente na substituição da válvula aórtica doente por uma válvula pulmonar autóloga, sendo esta, por sua vez, substituída por um aloenxerto pulmonar (Filová *et.al*, 2009; Mol *et.al*, 2009).

A seleção da válvula protésica apropriada depende das características individuais do doente, tais como a expectativa de vida, tolerância para a necessidade de reoperação e uso de anticoagulantes. Mas, no que toca à sobrevivência e qualidade de vida após cirurgia de substituição valvular, fatores como idade, função ventricular e comorbidade são fundamentais à recuperação do doente (Mol *et.al*, 2009).

Apesar de todas as vantagens inerentes a este tipo de próteses, existem ainda muitas limitações, sendo a principal desvantagem de ambas as válvulas (mecânicas e biológicas) a não-viabilidade. Por outras palavras, a incapacidade de crescimento e remodelação depois da implantação e, ainda, o facto de iniciarem degradação imediatamente após o implante (Sewell-Loftin *et.al*, 2011). Posto isto, uma nova abordagem tem vindo a ser desenvolvida com o intuito de encontrar as válvulas protésicas ideais. A engenharia de tecidos representa, desta forma, um caminho em evolução com capacidade para ultrapassar as limitações existentes, através da criação de uma válvula autóloga que previna a resposta imunológica e promova o crescimento, remodelação e reparação *in vivo* (Mol *et.al*, 2009).

2. ENGENHARIA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DAS VÁLVULAS CARDÍACAS

O conceito de engenharia de tecidos consiste na criação de um órgão que mimetize o nativo, quer na forma quer nas suas propriedades, tendo a capacidade de crescer, reparar e se remodelar. Desta forma, para se obterem válvulas cardíacas através de engenharia de tecidos é necessário ter em conta a estrutura e composição dessas mesmas válvulas (Figura 6) (Radoslaw *et.al*, 2012).

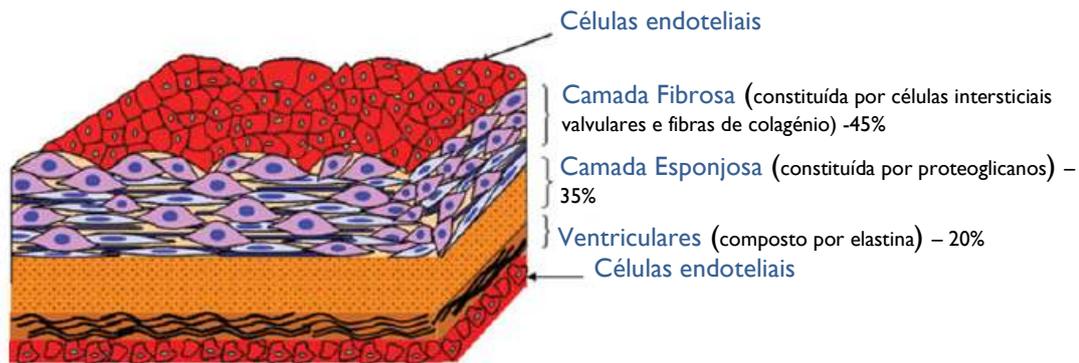


Figura 6 – Esquema das múltiplas camadas de uma válvula cardíaca. A válvula é revestida por endotélio, bastante resistente, alinhado perpendicularmente e que protege a válvula de danos, bem como de reações imunes e degeneração. Ventriculares é uma camada constituída por fibras densas de elastina (cedem bem à tração recuperando rapidamente a forma original). Internamente encontra-se uma camada esponjosa, constituída fundamentalmente por glicosaminoglicanos e algum colagénio, esta camada forma aquilo que se designa por *scaffold* ou matriz estrutural. Por fim, a camada fibrosa é um tecido essencialmente constituído por colagénio (Fonte: Adaptado de Radoslaw *et.al*, 2012).

A transplantação cardíaca poderia ser considerada uma solução final para doentes com patologias a este nível, não o é pela oferta limitada de órgãos dadores, custos elevados, fraca capacidade de reduzir ou inibir a atividade do sistema imunológico, entre outros. Desta forma, há a necessidade de melhorar os tratamentos tradicionais e desenvolver novas estratégias ao nível da ET para melhor lidar com a insuficiência cardíaca (Kim *et.al*, 2011).

O desenvolvimento de uma válvula protésica ideal, que possa ter uma longa durabilidade, se possível o resto da vida do doente, sem a necessidade de reoperação, de fácil implantação, com propriedades ótimas no que toca ao fluxo do sangue, sem degeneração, sem necessidade do uso de anticoagulantes e totalmente biofuncional, com capacidade regenerativa, é ainda uma quimera. Desta forma, acredita-se que seja a engenharia de tecidos o potencial promotor para este ideal (Radoslaw *et.al*, 2012).

Avanços recentes na ET têm vindo a mostrar resultados de sucesso no que toca às válvulas cardíacas derivadas da engenharia de tecidos (VCET). Os produtos desta engenharia incluem não só válvulas cardíacas, mas também cartilagem, osso, nervos, músculos, fígado, etc. Estas técnicas requerem geralmente o uso de *scaffolds* porosas, que servem de base tridimensional para a fixação inicial das células e subsequente formação de tecido *in vitro* e *in vivo*. Assim, a reconstrução ou substituição de órgãos a partir da ET requer três componentes: (1) células colhidas do órgão dador, (2) *scaffold* como suporte celular e (3) biomoléculas, tais como citocinas e fatores de crescimento, que promovam o crescimento

e/ou diferenciação do tipo de células desejadas (Dohmen *et.al*, 2009; Hutmacher, 2001; Kim *et.al*, 2011).

A principal função das válvulas cardíacas consiste na manutenção da unidirecionalidade do fluxo de sangue, através de forças mecânicas aplicadas aos folhetos durante o ciclo cardíaco. Especificamente, quando as válvulas fecham há uma pressão transvalvular que não permite o refluxo do sangue. Devido a esta pressão *in vivo*, as VCET têm de ser “pré-condicionadas”, *in vitro*, para resistir a este tipo de cargas mecânicas (Sewell-Loftin *et.al*, 2011).

2.1. SCAFFOLDS

Uma *scaffold* fornece o suporte necessário para que as células se fixem, proliferem e mantenham a sua função de diferenciação. As células podem ser expandidas em cultura e cultivadas numa *scaffold* porosa, 3D, que degradam e reabsorvem lentamente, como um tecido em crescimento, quer *in vivo* ou *in vitro* (Hutmacher, 2001).

As propriedades das *scaffolds* determinam o desenvolvimento dos tecidos ou órgãos lesados, pois é a *scaffold*-3D que está em contacto direto com as células humanas e que fornece as características necessárias para a proliferação e diferenciação celular (Li *et.al*, 2001).

Segundo Hutmacher (2001), as *scaffolds* podem ser fabricadas usando uma larga variedade de biomateriais, mas o critério para uma *scaffold* ideal baseia-se na escolha adequada dos seus constituintes. Na tabela que se segue apresentam-se as funções chave e respetivas características, para a obtenção de uma *scaffold* ideal.

Tabela 1 – Parâmetros estruturais das *scaffolds* para aplicação na engenharia de tecidos. (Adaptado de Edwards *et.al*, 2004)

Função da Scaffold	Característica adequada à função da Scaffold
Evitar resposta inflamatória de toxicidade <i>in vivo</i>	Biocompatível, não-tóxica e não carcinogénica
Promover o crescimento de tecidos e órgãos	Forma tridimensional (3D)
Semear elevada densidade de células	Alta porosidade e alta conectividade entre poros
Permitir adesão, proliferação e diferenciação celular	Superfície química apropriada
Permitir interações significativas entre a superfície celular e anexos celulares	Relação Área de superfície-Volume
Promover proliferação e migração celular e conduzir ao crescimento do tecido ao longo da <i>scaffold</i>	Tamanho de poros apropriados para permitir a penetração de células e interconectividade entre elas
Dirigir e orientar as células da MEC para a formação de novo tecido	Orientação certa das fibras dentro da <i>scaffold</i>
Permitir o movimento de nutrientes dentro e fora da <i>scaffold</i>	Alta porosidade e interconectividade entre os poros
Degradação da <i>scaffold</i> com permanência apenas do tecido natural	Taxa de degradação da <i>scaffold</i> não-tóxica nem inflamatória <i>in vivo</i>
Integridade estrutural <i>in vivo</i> suficiente, com tensão mecânica adequada para apoiar o tecido em desenvolvimento de forma a resistir a forças <i>in vivo</i>	Propriedades mecânicas da <i>scaffold</i> iguais às do tecido em desenvolvimento

A interação célula-superfície é um processo importante para a adesão celular e subsequente desenvolvimento do tecido (Figura 7). A atividade da superfície química das *scaffolds* assume função ativa no que toca à regularização do desenvolvimento tecidual. Tanto a proliferação como a diferenciação celular são geralmente reguladas através de proteínas da matriz extracelular que aderem à superfície (Li *et.al*, 2011).

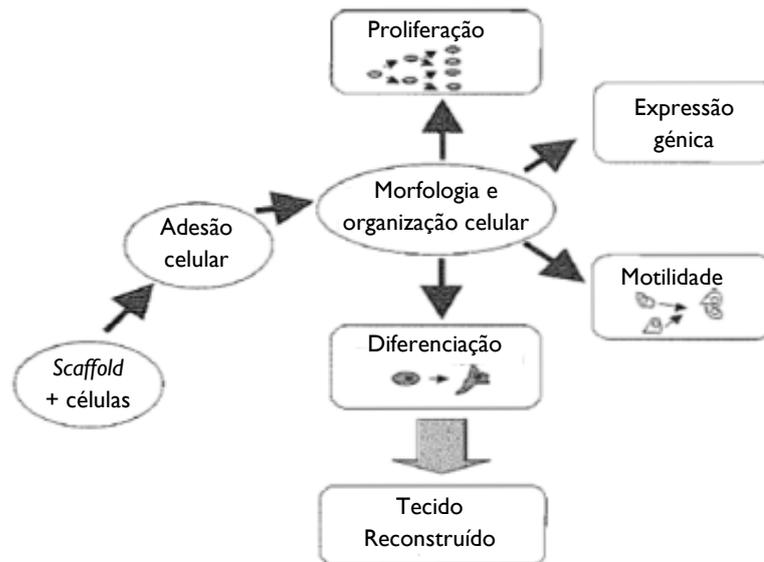


Figura 7 – A interação *scaffold*-células leva à adesão celular e posterior organização espacial do conjunto de células; de seguida pode ocorrer proliferação, expressão génica, motilidade ou diferenciação celular com posterior reconstrução do tecido. (Fonte: Adaptado de Li *et.al*, 2001)

Depois da implantação do dispositivo cardiovascular (*scaffold*) podem ocorrer situações de inflamação. Numa fase inicial, os neutrófilos e monócitos migram para a interface entre a superfície do implante e o tecido hospedeiro. Durante a fase de maturação, os fagócitos removem os detritos provenientes do trauma e enviam sinais aos fibroblastos e células do músculo liso para iniciarem a remodelação (2-3 semanas). No entanto, a resposta inflamatória pode continuar durante meses e até anos, tornando-se uma inflamação crónica (Simionescu *et.al*, 2011).

Com o intuito de contrariar qualquer situação de inflamação, há que ter em conta vários fatores importantes para a escolha dos biomateriais apropriados à construção da *scaffold*, pois estes devem ser racionalmente desenhados de forma a satisfazerem as aplicações alvo (Li *et.al*, 2001). O primeiro fator é a natureza do tecido ou órgão que necessita ser reparado ou substituído (a ET requer propriedades semelhantes às do tecido a ser regenerado), pois o biomaterial deve ser compatível, seguro e não-imunogénico. Um fator crítico para a preparação das *scaffolds* é a criação de uma estrutura 3D que mimetize a MEC, e a capacidade de induzir a formação do tecido apropriado e que oriente o desenvolvimento do novo órgão gerado. A chave para o sucesso das *scaffolds* é a rápida e completa integração no tecido hospedeiro (Kim *et.al*, 2011).

O facto das *scaffolds* serem preferencialmente em 3D, e não 2D, deve-se às visíveis vantagens que a primeira estrutura apresenta: sustenta uma grande densidade de células, permite um longo período de proliferação e progressivamente uma diferenciação aumentada, ao contrário da estrutura 2D, em que a proliferação é limitada devido a uma pequena área de superfície disponível e a atividade de diferenciação pode perder-se após um certo período de cultura (Li *et.al*, 2011).

2.1.1. TECIDOS XENOGÉNICOS ACELULARES

Com o avanço da tecnologia de processamento de tecidos biológicos, foi proposto o método de descclularização de forma a reduzir ou mesmo eliminar a antigenicidade dos enxertos, e assim melhorar os resultados a longo prazo. A necessidade deste processo deve-se ao facto da probabilidade de transmissão de doenças do dador para o hospedeiro (retrovírus endógeno de suíno ou espongiforme de bovino), deixando a origem da *scaffold* de ser o mais importante, mas sim o tratamento de descclularização a que está sujeita (Dohmen *et.al*, 2009; Navarro *et.al*, 2010).

Esta técnica tem um impacto diferente na preservação do tecido e eficiência da válvula, consistindo na remoção dos componentes celulares imunogénicos, restos celulares e DNA. Deve, também, preservar a integridade das fibras de colagénio e elásticas (glicoproteínas e elastina) essenciais à MEC, mantendo as suas propriedades biomecânicas. Desta forma, a MEC intacta, antigénica e sem citotoxicidade residual é um pré-requisito para a biocompatibilidade e longevidade dos enxertos (Dasi *et.al*, 2009; Navarro *et.al*, 2010).

A descclularização agressiva por enzimas (DNAse, RNAse, tripsina), *spit freezing* (congelamento) e radiação, usados pela tecnologia de SynerGraft (técnica patenteada pela empresa americana CryoLife), resultam numa falha catastrófica da descclularização das VC's xenogénicas, com disrupção da microestrutura da matriz. Por outro lado, VC's descclularizadas através de ácido deoxicólico (DOA) ou detergentes como dodecilsulfato de sódio (SDS) permitem manter a estrutura das proteínas (Filová *et.al*, 2009; Mol *et.al*, 2009).

Estudos mais recentes mostraram que o SDS talvez destabilizasse a tripla hélice do colagénio e provocasse deterioração do tecido. Verificou-se ainda que a MEC dilatava, aquando do uso de SDS, devido à destruição dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos extracelulares. Para piorar e levar mesmo à desistência do uso deste detergente, provou-se que a sua citotoxicidade teria influência no crescimento das células valvulares endoteliais e intersticiais do hospedeiro. Desta forma, mostrou-se, mais uma vez, a eficiência do tratamento de descclularização com DOA e mais recentemente com Triton-X100 de forma a preservar a estrutura da MEC (Dohmen, 2012).

Nesta abordagem das *scaffolds* xenogénicas podem ocorrer dois tipos diferentes de *seeding*, *in vitro* ou *in vivo*. No primeiro caso, as células são introduzidas no xenoenxerto acelular e cultivadas em bioreatores com condições propícias ao seu crescimento, e só posteriormente se efetua implantação no doente. Pelo contrário, *in vivo* ocorre primeiro a implantação do enxerto dador no hospedeiro, onde se dá a repovoação espontaneamente, através da migração e adesão das células endoteliais ou intersticiais. Neste último caso o doente é o seu próprio bioreator (Dohmen *et.al*, 2009; Dohmen, 2012; Sewell-Loftin *et.al*, 2011).

Devido à possibilidade de os xenoenxertos derivados de bovino e suíno desenvolverem calcificação, têm vindo a desenhar-se novas *scaffolds* de forma a promover melhorias neste sentido.

2.1.2. BIOMATERIAIS

Há diferentes tipos de biomateriais que potencialmente permitem o desenvolvimento e aperfeiçoamento de *scaffolds* para medicina regenerativa. Têm sido frequentemente usados biomateriais naturais e sintéticos adaptados de forma a criar um ambiente natural tridimensional que suporte os sinais biológicos para o crescimento e reorganização tecidual. Podem ser usadas modificações na superfície das *scaffolds* de forma a melhorar as propriedades seletivas (tais como biocompatibilidade) dos materiais poliméricos sem alteração das suas propriedades estruturais (Ghanbari *et.al*, 2009; Kim *et.al*, 2011).

A escolha do material é um elemento crucial no desenvolvimento das válvulas cardíacas poliméricas, pois determina o fator durabilidade e biocompatibilidade (Ghanbari *et.al*, 2009).

2.1.1.1. BIOMATERIAIS NATURAIS

Os polímeros de origem natural têm vindo a ser alvo de muitos estudos pelo facto de as suas propriedades se compararem com as dos tecidos nativos e pela possibilidade de induzirem sinais biológicos necessários para conduzir e controlar o crescimento celular (Sewll-Loftin *et.al*, 2011).

Estes polímeros são vantajosos no que toca às propriedades de biocompatibilidade, abundância e facilidade de processamento. De uma forma breve, os biomateriais naturais são capazes de se ajustar ao microambiente do hospedeiro e induzirem respostas inflamatórias ligeiras, *in vivo*. Por outro lado, a sua composição varia de lote para lote e depende fortemente do procedimento de isolamento usado (Kim *et.al*, 2011).

Na tabela que se segue, descrevem-se diversos polímeros naturais, à disposição da medicina regenerativa e algumas das suas principais características.

Tabela 2 – Características, desvantagens e vantagens dos polímeros naturais mais comuns na medicina. (Fonte: Assis *et.al*, 2003; Dasi *et.al*, 2009; Filová *et.al*, 2009; Kim *et.al*, 2011;)

Polímeros naturais	Características	Desvantagens	Vantagens
<u>Colagénio</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Principal proteína do tecido conjuntivo e mais abundante em mamíferos • Divide-se em 29 tipos (Tipo I mais abundante e mais estudado) <p>Scaffolds: Sob a forma de espuma, gel, folha ou esponja; facilmente moldadas; possuem porosidade permitindo a perfusão do meio biológico; suportam a atividade de muitas moléculas biológicas; depois de removidos os telopeptídeos são potencialmente não-imunogénicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil de obter a partir dos doentes; • Insegurança do tecido animal derivado de colagénio • Difícil de processar • Não possuem o grau de resistência mecânica desejado • A esterilização necessária à aplicação <i>in vivo</i> pode induzir a alterações da proteína 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas de purificação desenvolvidas (ex: tratamentos enzimáticos) que podem eliminar telopeptídeos imunogénicos • Pode ser usado na sua forma intacta por ser a principal proteína da MEC • Pode ser reforçado por métodos de <i>cross-linking</i>, melhorando a resistência mecânica e prevenindo alterações estruturais
<u>Gelatina</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína polimérica natural produzida por hidrólise parcial do colagénio • Substância translúcida, incolor, praticamente insípida e inodora • Possui uma cadeia rígida e peso molecular elevado <p>Scaffolds: Podem ser usadas na sua forma intacta ou preparada como esponjas ou hidrogéis injetáveis; preparadas por <i>cross-linking</i>; taxa de degradação dependente da extensão do <i>cross-linking</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Por ser desnaturada possui baixa antigenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Biodegradável e biocompatível em ambientes fisiológicos, sendo frequentemente usada como agente gelificante em aplicações farmacêuticas e médicas • Enzimaticamente degradada no corpo ao longo do tempo • Diversidade estrutural, segurança e possibilidade eletrostática entre iões de cargas diferentes

<p style="text-align: center;"><u>Submucosa do intestino delgado (SID)</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Constituída por MEC que não apresenta tendência a rejeição • Obtida de um segmento de jejuno proximal de porco (com remoção da mucosa e do extrato seromuscular) • Segmento de fibras da SID preferencialmente preferido ao longo do eixo longitudinal do intestino <p>Scaffolds: Comportamento mecânico ortotrópico (direção longitudinal das fibras com maior rigidez e resistência que a direção transversal); usadas na forma de folha intacta ou em pó; esponjas de SID preparadas por <i>cross-linking</i>; SID na forma de líquido ou gel com elevada extensão biomédica (métodos pouco invasivos)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de rompimento do segmento do porco, no processo de remoção da mucosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Permite o crescimento de vasos sanguíneos, diferenciação celular e resistência contra o desenvolvimento de processos infecciosos • Contém grande variedade de citocinas (fator de crescimento fibroblástico básico, fibronectinas, heparinas, etc)
<p style="text-align: center;"><u>Quitosano</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Obtido através da total ou parcial deacetilação da quitina (polímero natural e abundante) por hidrólise alcalina a elevadas temperaturas • Comportamento de resposta ao pH devido aos polímeros dos grupos amina • Dissolve facilmente em pH baixo • Fácil formação de géis <p>Scaffolds: Obtidas quimicamente por <i>cross-linking</i> (interações eletrostáticas entre grupos amino, catiónicos e aniónicos), obtendo estruturas 2D e 3D</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Insolúvel em pH's elevados; • Materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si, devido aos diferentes processos de deacetilação 	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatível • Biodegradável • Não-tóxico • Não-antigénico • Biofuncional

<p style="text-align: center;"><u>Alginato</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Polissacarídeo muito estudado • Alginato comercial extraído de três espécies de algas castanhas (<i>Macrocystis pyrifera</i>, <i>Ascophyllum nodosum</i> e vários tipos de <i>Laminaria</i>) • Alginato bacteriano produzido a partir de <i>Pseudomonas</i> e <i>Azotobacter</i> spp • Cadeia linear, constituída por três “blocos” de comprimento variável • Polímero aniónico • Gelifica aquando da interação com catiões (divalentes ou monovalentes) – ácido algínico <p>Scaffolds: De <i>microbeads</i>, géis e hidrogéis devido às suas biocaracterísticas e condições suaves em que ocorre a gelificação; para controlar a reversibilidade da gelificação, são usados gelatina, tetraborato de sódio ou albumina com catiões polivalentes;</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Composição propensa a variabilidade devido a variações sazonais e ambientais • Gelificação reversível, após perda de catiões divalentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatível e biodegradável • Abundante na natureza
<p style="text-align: center;"><u>Ácido Hialurónico (AH)</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Polímero natural encontrado em muitos tecidos conjuntivos (pele, cartilagem) • Polissacarídeo linear formado por ácido glucorónico e N-acetilglicosamina • Encontrado em diferentes proporções <i>in vivo</i> • Obtido a partir de animais ou fermentação de bactérias (fácil e controlado) • Serve muitas funções fisiológicas (tecidos, regulação da água) e possui propriedades estruturais e de preenchimento de espaços <p>Scaffolds: Propriedades significativamente melhoradas por <i>cross-linking</i>, direta ou indiretamente, formando hidrogéis</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Obtém-se em grande escala e elimina riscos de patogénese derivada de animais, quando obtido através de bactérias, como <i>Streptococci</i> • Altamente biocompatível, não-imunogénico, não trombogénico e viscoelástico • Componente muito comum da MEC em tecidos

Fibrina	<ul style="list-style-type: none"> • Composta por dois componentes essenciais: <ul style="list-style-type: none"> - Fibrinogénio: glicoproteína solúvel no plasma, sintetizada pelo fígado e contendo elevada concentração de fibrinogénio humano; - Trombina: contém elevada concentração de trombina humana e cloreto de cálcio, fator crucial na conversão enzimática do fibrinogénio em fibrina: Fibrinogénio + Trombina → fibrinogénio convertido em monómeros de fibrina • Os monómeros sofrem polimerização formando cadeias longas que formam, de seguida, um coágulo estruturado semelhante a um coágulo fisiológico, simulando as fases finais da cascata de coagulação natural <p>Scaffolds: É possível controlar a degradação da fibrina por <i>cross-linking</i> ou usando inibidores enzimáticos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Completamente degradável (desvantajoso quando se requer uma forma específica de <i>scaffold</i>) • Baixa capacidade de difusão 	<ul style="list-style-type: none"> • Polímero biodegradável; • Completamente degradável (vantajoso em certas aplicações <i>in vivo</i>); • Não induz inflamação
---------	--	---	--

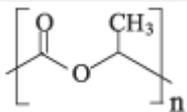
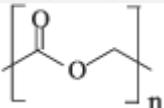
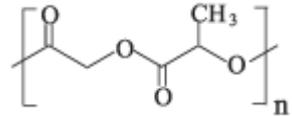
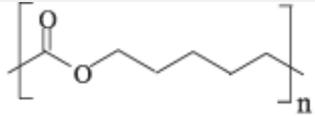
2.1.1.2. BIOMATERIAIS SINTÉTICOS

Tem vindo a dar-se alguma importância e atenção à obtenção de polímeros com origem sintética. Contrariamente aos polímeros acima descritos, estes são reproduzidos facilmente, em larga escala e através de processos que permitem definir e controlar as suas propriedades mecânicas. Apesar de poderem reduzir a resposta imune, quando degradados de forma incompleta podem conduzir a situações de inflamação (Filová *et.al*, 2010; Kim *et.al*, 2011).

Com o intuito de aumentar o potencial de crescimento e remodelação dos tecidos lesados, *scaffolds* sintéticas são cada vez mais uma opção na medicina regenerativa (Mol *et.al*, 2009).

Desta forma, na tabela que se segue, apresentam-se os materiais sintéticos, com capacidade biodegradável, mais frequentes e disponíveis atualmente.

Tabela 3 – Polímeros sintéticos com capacidade biodegradável e suas características. (Fonte: Junior *et.al*, 2007; Kim *et.al*, 2011; Mol *et.al*, 2009; Rosa *et.al*, 2000).

Polímeros sintéticos	Características
<p>Poli(etileno)glicol (PEG)</p> $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\right]_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	<ul style="list-style-type: none"> • Não-iônico, biocompatível e com excelentes propriedades físico-químicas e biológicas • Resistente à adsorção de proteínas e adesão celular (características que minimizam a resposta imune após implantação) • Usado principalmente sob a forma de hidrogel • Hidrogéis hidrofílicos produzidos através de uma variedade de <i>cross-linking</i>, com propriedades físico-químicas sintonizáveis (permeabilidade, difusividade molecular, equilíbrio do teor de água, elasticidade, taxa de degradação);
<p>Ácido Polilático (PLA)</p>  <p>Ácido Poliglicólico (PGA)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliésteres muito usados na fabricação de <i>scaffolds</i> • Sintetizados a partir da polimerização do composto em anel do glicolídeo (PGA) e do lactídeo (PLA) • Pobremente solúveis em solventes • Variando as suas proporções na <i>scaffold</i> é possível ajustar a taxa de degradação desta última • PLA com vantagem em relação ao PGA, devido à capacidade de desenvolver estruturas geométricas mais complexas
<p>Ácido polilático-co-glicólico (PLGA)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliéster muito usado na fabricação de <i>scaffolds</i> • Polímero biodegradável e biocompatível • Sintetizado por copolimerização aleatória com abertura do anel de uma mistura de ácido glicólico e lático • Obtidos diferentes tipos de PLGA através da variação da proporção de ácido glicólico e lático, utilizados durante a polimerização • Dissolve numa ampla gama de solventes • <i>Scaffolds</i> de PLGA degradadas em condições fisiológicas normais com taxas de degradação que dependem das propriedades do copolímero (grau de cristalinidade, peso molecular, fatores locais) • Degradado por hidrólise produzindo monómeros originais (ácido glicólico e ácido lático), que podem ser absorvidos pelo organismo
<p>Policaprolactona (PCL)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Poliéster alifático biocompatível, bioreabsorvível e biodegradável • Obtido através de polimerização de abertura de anel de ϵ-Caprolactona usando um catalisador • Compatível com tecidos moles e duros • Degradado sob condições fisiológicas por meio de hidrólise das suas ligações éster • Bom material para <i>scaffolds</i> devido à sua taxa de degradação lenta, ideal para aplicações de implantação a longo-prazo • Com capacidade para desenvolver estruturas geométricas complexas

<p>Polihidroxibutirato (PHB)</p> $\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$	<ul style="list-style-type: none"> • Polímero biocompatível, biodegradável, termoplástico e não-tóxico • Produzido naturalmente através de microrganismos (bactéria <i>Alcaligenes eutophorus</i>, que acumula sob a forma de grânulos intracelulares a partir de substâncias como a glicose e a sacarose), bem como através de plantas geneticamente modificadas • Polímero completamente degradado, gerando CO₂ e convertido à biomassa por bactérias, fungos e leveduras
---	---

Está disponível em 3D uma *scaffold* aprovada para implantação, pela FDA, responsável pela entrega do fármaco, sutura e barreiras de adesão designada de 3DInsert™-PCL. Esta é constituída pelo poliéster PCL (Figura 8) [10].

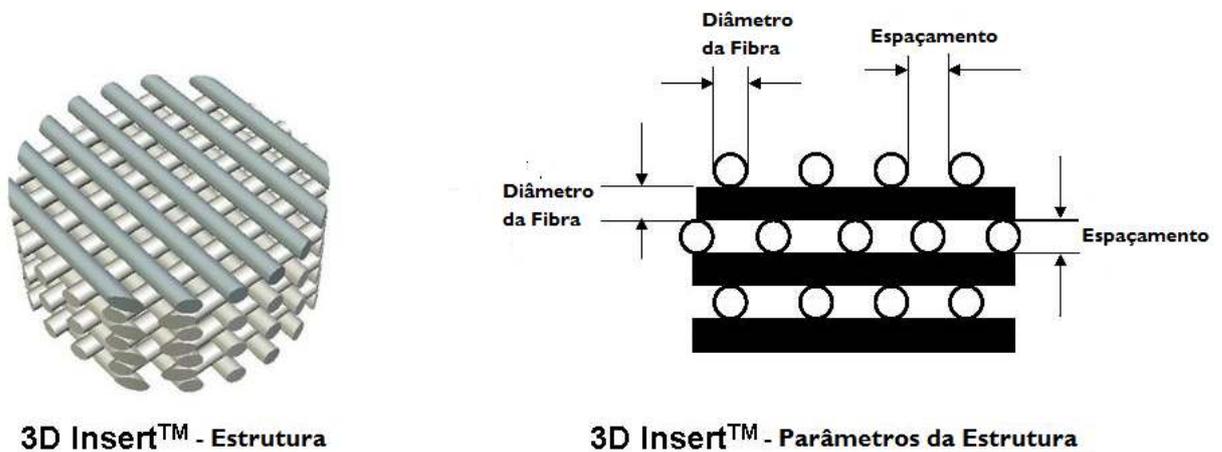


Figura 8 – Estrutura tridimensional e parâmetros da estrutura de *scaffold* constituída por Policaprolactona (PCL), com fins de investigação em engenharia de tecidos. Os poros desta estrutura são 100% abertos e interligados, facilitando a adesão das células, a troca de nutrientes e dos resíduos do metabolismo (in [9]).

2.2. CONCEÇÃO DE ESTRUTURAS

Está bem estabelecido que a anatomia estrutural da válvula desempenha um papel essencial na sua função operativa, proporcionando uma estrutura competente e estável com características anatómicas e histológicas específicas. Considerando a grande complexidade da anatomia das válvulas naturais, é difícil criar estruturas que tenham características anatómicas e funcionais exatamente iguais às da válvula nativa (Ghanbari *et.al*, 2009).

Para a criação de válvulas a partir do desenho de estruturas, é necessário ter em conta alguns parâmetros.

Tabela 4 – Requisitos essenciais ao desenho de válvulas cardíacas (Fonte: Adaptado de Ghanbari *et.al*, 2009)

-
-
- A válvula protésica deve-se adaptar bem à anatomia do novo hospedeiro;
 - Os folhetos devem oferecer o mínimo de resistência ao fluxo de sangue e permitir uma diferença de pressão transvalvular sistólica;
 - De forma a não ocorrer refluxo os folhetos devem garantir um fecho adequado;
 - O dano para as células sanguíneas e trombogenicidade deve ser minimizado;
 - Os picos de stress nos componentes valvulares devem ser tão baixos quanto possível, durante todo o ciclo cardíaco, para garantir a durabilidade e ocorrência de alterações mínimas nas características geométricas.
-
-

3. CÉLULAS ESTAMINAIS E REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS

A utilização de células estaminais (CE) aliada à engenharia de tecidos permite antever a possibilidade de evitar o uso de próteses, quer naturais quer sintéticas. A transplantação celular é uma abordagem atrativa, mas a reprodutibilidade dos resultados ainda pode constituir um problema (Garbern *et.al*, 2013). Este trabalho foca-se apenas na regeneração das VC's e não do coração em geral, no entanto é interessante destacar o artigo de Hansson *et.al* (2009), direcionado para este último tópico.

A terapia com células estaminais tem vindo a ganhar reconhecimento ao longo das últimas décadas. Estas células são indiferenciadas e com capacidade de se dividirem indefinidamente dando origem a diversos tipos de linhagens celulares. A descoberta destas células com potencial para se tornarem maduras e com características e funções especializadas, como por exemplo, células nervosas, células cardíacas, células da pele, do sangue, do osso e da cartilagem, levou o conceito de terapia regenerativa aplicada à cardiologia a ganhar forma [10].

A engenharia de tecidos encontra limitações no uso de próteses valvulares, pois estas envolvem o isolamento e expansão de células autólogas e subsequente cultivo das mesmas, numa *scaffold* adequada, com posterior implantação no doente. Enquanto que células provenientes de um dador requerem colheita de um tecido intacto e mostram algumas limitações na sua expansão, o uso de células estaminais pode ajudar a ultrapassar estas últimas. As células estaminais como fonte para a regeneração de válvulas cardíacas podem ter origem do sangue, medula óssea, tecido adiposo, líquido amniótico, cordão umbilical, e são usadas *in vitro* pela ET (Weber *et.al*, 2012).

Em função da sua origem e/ou capacidade de diferenciação, as células estaminais dividem-se em dois grandes grupos, o das células estaminais embrionárias (CEE's) e células estaminais adultas (CEA's), como se pode observar na figura 9.

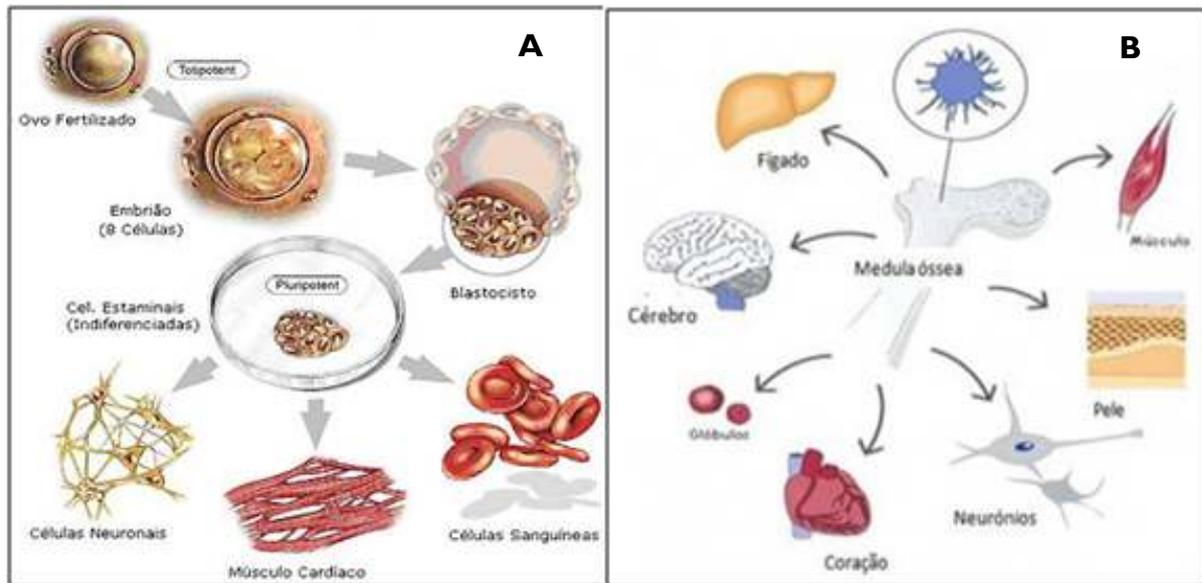


Figura 9 – As células estaminais renovam-se por um processo de divisão contínua, durante longos períodos de tempo, ou seja, indefinidamente, (A) Células Estaminais Embrionárias – células que existem numa fase inicial do desenvolvimento do embrião humano, o blastocisto, antes da introdução nas paredes do útero. São células pluripotentes, isto é, têm a capacidade de se diferenciarem em qualquer tipo de tecidos ou órgãos do organismo. (B) Células Estaminais Adultas – são células mais especializadas que as embrionárias. Estas células são obtidas após o nascimento, não são diferenciadas e podem encontrar-se em diferentes partes do nosso organismo, isto é, em tecidos especializados e diferenciados, Têm ainda a capacidade de se auto-renovarem ao longo de toda a vida do organismo – multipotentes. (in [10]).

Devido às desvantagens referidas acerca do método de obtenção das próteses valvulares, muitos investigadores têm, desta forma, vindo a focar-se nas CE's, principalmente nas mesenquimais com origem na medula óssea, bem como nas provenientes do sangue do cordão umbilical (CU) ou de doadores. O facto de a colheita destas células ser fácil e de mínima invasividade para o indivíduo, torna-se mais uma vantagem ao uso das mesmas por parte dos investigadores (Radoslaw *et.al*, 2012).

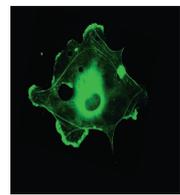
Ocorrem por ano cerca de 290 000 substituições de válvulas cardíacas e é espectável que o número de substituições triplique para o ano de 2050 (Weber *et.al*, 2012).

3.1. CÉLULAS ESTAMINAIS EM REGENERAÇÃO DE VÁLVULAS CARDÍACAS

As células estaminais são definidas pela sua capacidade de se diferenciarem em qualquer tipo de células do corpo humano. Em estudos clínicos, uma larga variedade destas células tem sido considerada uma boa aposta para a reparação de válvulas cardíacas. De forma a evitar o sacrifício das estruturas vasculares dos doentes sujeitos a cirurgia, diferentes fontes de CE's têm sido investigadas (Weber *et.al*, 2012).

Na tabela que se segue, apresentam-se algumas dessas células.

Tabela 5 – Células estaminais e sua origem, vantagens e desvantagens das mesmas na reparação cardíaca. (Foles *et.al*, 2011; Hansson *et.al*, 2009; Radoslaw *et.al*, 2012; in [10]; in [11]; in [12]).

Células Estaminais	Origem das células	Vantagens	Desvantagens	Imagem
Embrionárias	<ul style="list-style-type: none"> • Massa celular do blastocisto (embrião) • Tecido conjuntivo (fibroblastos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de auto-renovação e de diferenciação • Capacidade de formarem cardiomiócitos (fibra muscular cardíaca) 	<ul style="list-style-type: none"> • Considerações éticas e legais 	
Pluripotentes induzidas	<ul style="list-style-type: none"> • Células somáticas adultas (células diferenciadas e não-pluripotentes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Compatibilidade genética 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo de reprogramação pouco eficiente • Utilização de vírus como vetores (provável contaminação com DNA viroso) 	
Mesenquimais	<ul style="list-style-type: none"> • Sangue do CU • Matriz do CU • Medula óssea 	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de isolar e expandir em cultura • Capacidade de auto-renovação e multiplicação elevada • Isolamento a 100% através da matriz do CU 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil isolamento a partir do sangue do CU • Obtenção dolorosa a partir da medula óssea (uso de anestesia) 	
Endoteliais	<ul style="list-style-type: none"> • Medula óssea • Sangue periférico 	<ul style="list-style-type: none"> • Promovem a neovascularização • Produzem fatores de crescimento, aumentando a quantidade de células estaminais adultas; • Instruem as células estaminais adultas a diferenciarem-se em células do sistema imunológico 	<ul style="list-style-type: none"> • Expansão celular <i>in vitro</i> para contornar a escassez de CE's 	

As células estaminais ou progenitoras apresentam diversas vantagens, tais como o potencial de se diferenciarem em diversas linhagens *in vivo* através de estímulos bioquímicos e mecânicos; características imunológicas que permanecem em ambientes alogênicos; e elevada capacidade de proliferação (Weber *et.al*, 2012).

A figura que se segue apresenta as diversas linhagens celulares obtidas através das diferentes células estaminais. E, ainda, um pequeno esquema do percurso de obtenção de válvulas cardíacas através do uso de uma *scaffold* e células estaminais isoladas e cultivadas *in vitro*.

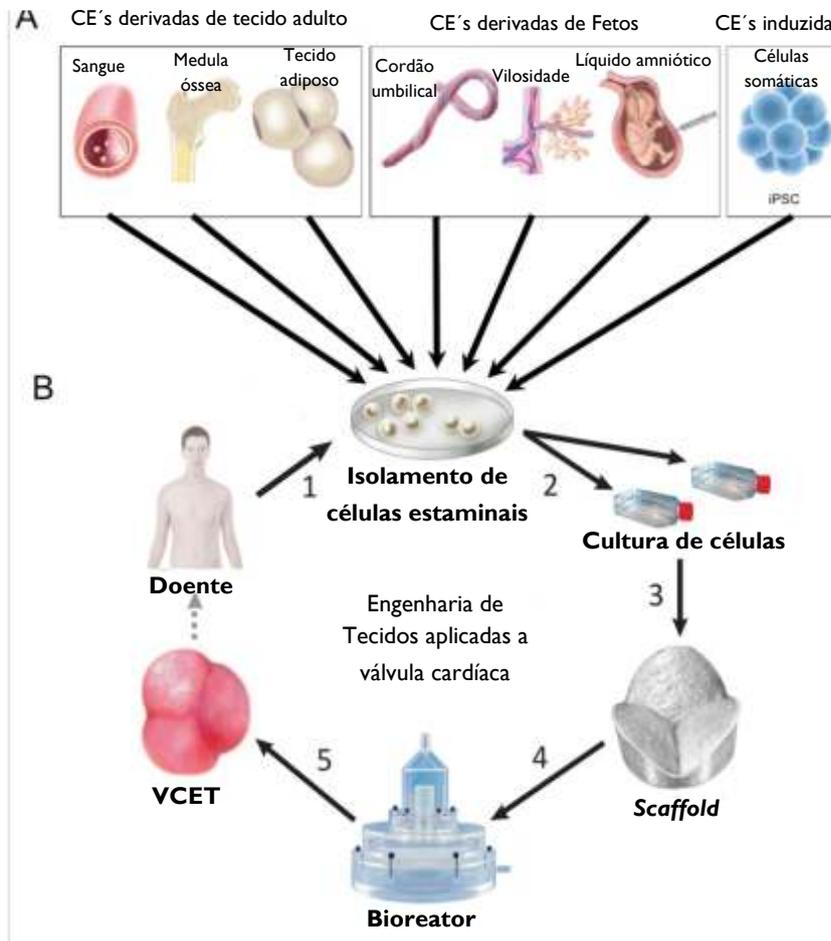


Figura 10 – (A) Diferentes origens das células estaminais: de tecido adulto, de fetos e de células induzidas por reprogramação de células diferenciadas. (B) Recolhidas células de um doente, com posterior introdução das mesmas *in vitro* para a obtenção de válvulas cardíacas através da engenharia de tecidos - Inicialmente ocorre isolamento das CE's colhidas de tecido adulto, com posterior expansão das mesmas em cultura de células. Depois de obtidas as células e escolhida a *scaffold* adequada, ocorre o processo de cultivo. Através de diversas condições dinâmicas num bioreator são obtidas as válvulas cardíacas desejadas. (Fonte: Adaptado de Weber *et.al*, 2012).

Recentemente o interesse em gerar células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) tem aumentado, pois estas são especialmente destinadas à regeneração de tecidos. Estas células são obtidas a partir da extração de células somáticas diferenciadas, que já não se dividem, do organismo adulto e através de técnicas específicas é possível transformá-las em células capazes de gerar todo o tipo de tecido humano (células estaminais embrionárias). Como estas células são produzidas a partir de células do individuo que irá receber o transplante, o risco de incompatibilidade genética reduz, podendo mesmo desaparecer [12].

Apesar deste trabalho se focar apenas nas válvulas cardíacas, é de destacar o artigo de Yu *et.al*, (2013) que relata um estudo, para a regeneração do coração, baseado na diferenciação *in vivo* de cardiomiócitos derivados de células estaminais pluripotentes induzidas contendo organelos cardíacos específicos e sistemas de adesão.

4. CASOS CLÍNICOS

Atualmente, a engenharia de tecidos tem vindo a desenvolver estudos, conseguindo obter resultados bastante favoráveis em diversas aplicações incluindo as válvulas cardíacas. Neste capítulo, referenciam-se alguns estudos e seus resultados.

4.1) FOLHETOS VALVULARES CARDÍACOS DESCELULARIZADOS COM POTENCIAL DE RECELULARIZAÇÃO

Este ponto refere um estudo efetuado por um grupo de investigadores, liderado por Syedain ZH, no departamento de Engenharia Biomédica da Universidade de Minnesota, EUA.

Syedain *et.al* (2013) promoveu um estudo mais direcionado para doentes de pediatria, passou vários meses a observar, *in vivo*, a contração e regurgitação dos folhetos de válvulas cardíacas implantadas.

Para promover o desenvolvimento de MEC madura, colocaram-se células contráteis numa *scaffold* de fibrina, que levou à formação dos folhetos da nova válvula cardíaca. Após a formação dos folhetos, removeram-se as células por tratamento com detergentes (1% de SDS e 1% de Triton), onde as analisaram por quantificação de DNA e Western Blot.

Os resultados das análises provaram que a MEC formada não apresentava alterações significativas em relação à nativa. Para além disso, testaram também o potencial de recelularização dos folhetos descelularizados, através do cultivo de células estaminais mesenquimais (CEM's) na superfície dos mesmos. O estudo durou cerca de 1-3 semanas e foi dividido em dois meios de cultura, M1 e M2. No primeiro permaneceu o fenótipo das CEM's e no segundo promoveu-se o potencial de diferenciação dessas últimas em células com fenótipo intersticial.

Como resultado, Syedain *et.al* (2013), verificou que os folhetos foram recelularizados em maior concentração no meio de cultura M2, seguido de M1, com mínima invasão de células nos folhetos nativos descelularizados.

4.2) VÁLVULAS CARDÍACAS HUMANAS USANDO CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DO CORDÃO UMBILICAL

O trabalho desenvolvido por Sodian *et.al* (2006), no Departamento de Cirurgia Cardiorácica e Vascular, de Fisiologia, de Biologia Celular, de Neurobiologia e de Cirurgia Cardiovascular, de diferentes universidades de Berlim, mostra o potencial das células estaminais do cordão umbilical no que toca à patologia das válvulas cardíacas.

Após um nascimento, o cordão umbilical foi colhido, possibilitando o isolamento de células vasculares. Algumas semanas após o nascimento criopreservaram-se células vasculares do cordão umbilical e investigou-se a capacidade destas servirem como uma boa fonte para válvulas cardíacas.

Neste trabalho isolaram-se segmentos vasculares do cordão umbilical e criopreservaram-se num banco de células, durante cerca de 12 semanas. Ao fim desse tempo, as células foram expandidas em cultura e analisadas por histologia,

imunohistoquímica e por ensaios de proliferação. Adicionalmente foi fabricada uma *scaffold* porosa com características biodegradáveis (polímero poli-4-hidroxi-butirato) onde se colocaram as células criopreservadas do cordão umbilical. Depois do método de cultivo ocorreu crescimento *in vitro* pois a *scaffold* foi colocada num sistema dinâmico de cultura de células (bioreator). Para finalizar, a válvula obtida foi implantada no doente (Figura 11).

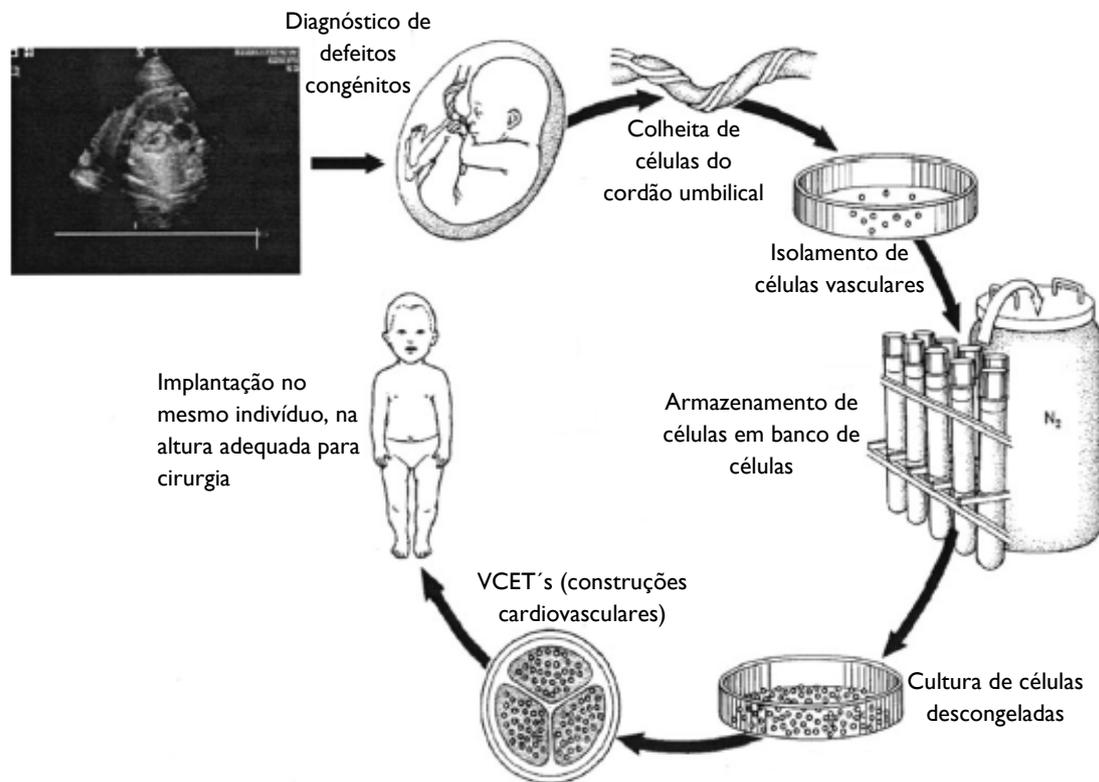


Figura 11 – Engenharia de tecidos para o fabrico de válvula cardíaca humana – Inicialmente efetuada ecocardiografia fetal de diagnóstico cardíaco com defeitos congénitos. Devido aos resultados do diagnóstico células da parede vascular do cordão umbilical são colhidas, isoladas, expandidas *in vitro* e criopreservadas em bancos de células. Na altura ideal para cirurgia, as células criopreservadas são descongeladas e recultivadas numa *scaffold* biodegradável, com características de válvula cardíaca. Num bioreator há construção celular (sistema de cultura de células com características dinâmicas) e crescimento *in vitro*. Depois da maturação no bioreator, a válvula cardíaca proveniente da engenharia de tecidos é implantada no mesmo doente (Fonte: Adaptado de Sodian *et.al*, 2006)

Os investigadores observaram que o processo *in vitro* ocorreu sem quaisquer contaminações e ainda, que obtiveram mais de três vezes a quantidade de células que necessitariam para a construção do tecido desejado.

O estudo focou-se em modelos animais, mas devido aos resultados favoráveis das várias experiências começam a criar-se condições para potencial aplicação em humanos.

4.3) CÉLULAS ESTAMINAIS ADMINISTRADAS POR CATETER – IMPLANTAÇÃO DE VÁLVULA AÓRTICA

O objetivo de estudo de Emmert *et.al* (2012) foi investigar a fiabilidade da implantação de células estaminais, através de um cateter, na posição da válvula aórtica (Figura 12).

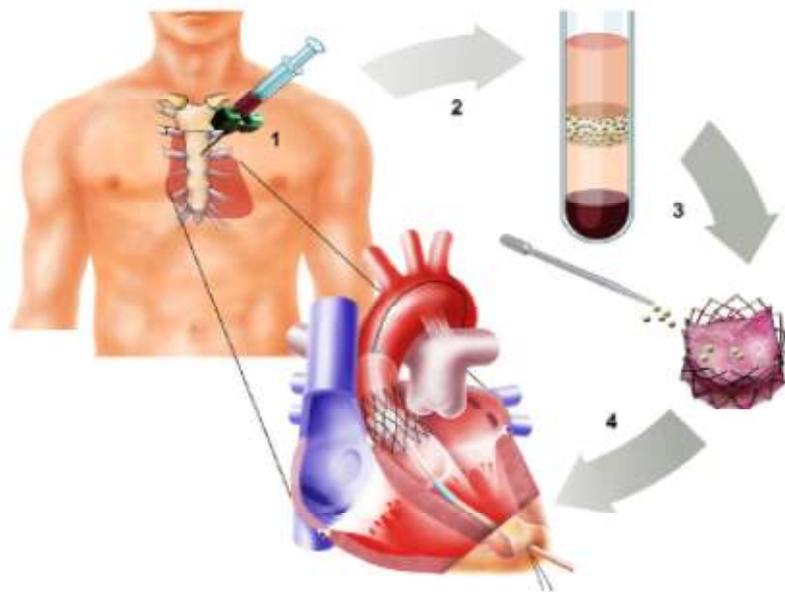


Figura 12 – Células estaminais transportadas em cateter, para a posição da válvula aórtica. (1) A medula óssea é aspirada do esterno para uma seringa com heparina, (2) posteriormente as células mononucleares, da medula, são obtidas por centrifugação (3) e cultivadas numa *scaffold* de fibrina acoplada a um *stent* de válvula cardíaca. (4) Quando o cateter atinge o ponto alvo, sofre dilatação libertando o dispositivo. A duração deste processo, desde a colheita das células até à sua implantação, demora cerca de 2h. (Adaptado de: Emmert *et.al*, 2013)

O estudo deste grupo de investigadores foi feito num conjunto de 12 animais, divididos em 3 grupos, consoante o tempo de acompanhamento (Grupo A – a cada 4h; Grupo B – a cada 48h, Grupo C – 1 a 2 semanas).

O primeiro grupo de experiências (Grupo A) foi estudado sob condições extremas, de forma a estabelecer viabilidade técnica da implantação da nova válvula cardíaca em posição aórtica, com especial interesse nos aspetos técnicos, isto é, inserção do dispositivo e o posicionamento ótimo tendo em conta as condições anatómicas da aorta.

De forma a poder avaliar a estabilidade e funcionalidade da válvula, bem como a rápida remodelação tecidual, os outros grupos (B e C) foram seguidos num espaçamento de tempo maior (Figura 13).

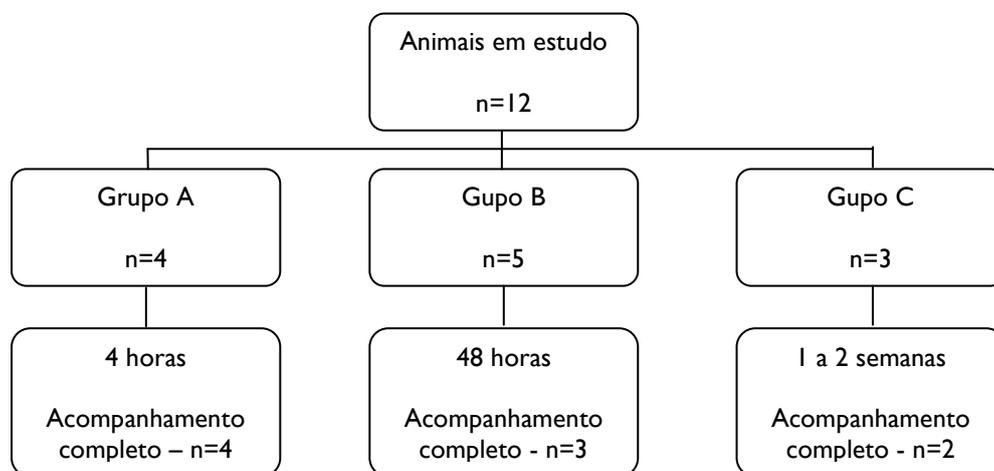


Figura 13 – Distribuição dos animais em estudo por grupos, de acordo com o tempo de acompanhamento. No grupo A todos os animais foram seguidos devidamente, já no grupo B, só 3 dos 5 terminaram o acompanhamento. Por fim, no grupo D, um deles terminou ao fim de 1 semana e outro ao fim de 2 semanas (Adaptado de Emmert *et.al*, 2013).

Uma *scaffold* de fibrina, com 3 folhetos, foi usada para transportar as células mononucleares provenientes da medula óssea de ovino, assim como também serviu de condutora do *stent*. Antes de qualquer implantação no animal doente, foi avaliado qual o tamanho ideal do *stent*, tendo em conta o anel da aorta.

Após operação, a posição do *stent* foi controlada por angiografia e tomografia e a anticoagulação efetuada com o recurso a aspirina (100mg/dia).

No grupo B, dois dos cinco animais não terminaram o acompanhamento. Um deles sofreu insuficiência cardíaca aguda após a implantação do dispositivo perto da saída do ventrículo esquerda, que após algumas horas acabou por migrar para dentro deste último. A entrega do dispositivo no outro animal foi bem-sucedida, mas apesar disso este acabou por não aguentar pois ocorreu, após algumas horas, disfunção grave de folheto valvular que levou à ocorrência de regurgitação. No grupo C um animal também não sobreviveu devido a uma deslocação do *stent*.

Exceto os animais que não resistiram ao estudo, todos os outros toleraram bem todo o procedimento sem quaisquer complicações hemodinâmicas, verificando-se até uma boa circulação sistémica, com abertura e fecho controlados da nova válvula.

5. CONCLUSÃO

O objetivo principal desta dissertação foi rever a utilização da engenharia de tecidos aplicada às doenças cardiovasculares, focando-se na aplicação de válvulas cardíacas com origem em tecidos xenogénicos (descelularizados), *scaffolds* (naturais ou sintéticas) e células estaminais.

A principal aplicação da engenharia de tecidos recai na obtenção de métodos simples de gerar *scaffolds* biocompatíveis, biodegradáveis e vascularizadas com a mesma complexidade da observada nos tecidos nativos. Estes métodos podem ir além da engenharia das válvulas cardíacas, tendo-se vindo a verificar igual sucesso em órgãos como o fígado, pulmão, rim, entre outros.

A incapacidade das válvulas cardíacas crescerem ou se remodelarem depois da reparação ou reconstrução de estruturas cardiovasculares, por cirurgia, quer em indivíduos adultos ou jovens, leva a uma elevada fonte de morbilidade e mortalidade. Aplicações como, *scaffolds* de origem sintética ou natural, solucionam de alguma forma alguns dos problemas provenientes das cirurgias de reparação valvular, pois é possível escolher o material adequado, tendo em conta a durabilidade pretendida.

Apesar de todas as vantagens inerentes a estes dispositivos há ainda várias dificuldades que se espera venham a ser ultrapassadas graças ao uso de células estaminais. Estas células podem ser obtidas a partir de embriões (células estaminais embrionárias), diferentes linhagens celulares do organismo (células estaminais adultas) ou ainda por reprogramação de células somáticas do próprio doente. Depois de isoladas ou reprogramadas podem ser diferenciadas de forma a adquirirem as condições adequadas à sua função no miocárdio, reduzindo a possibilidade de inflamação e rejeição por parte do organismo do doente e reproduzindo tanto quanto possível a arquitetura e funcionalidade da válvula original.

ANEXOS

I. Dados Europeus de colheita de Tecidos

	Córneas <i>Cornea</i>	Membrana Amniótica <i>Amniotic Membrane</i>	Vasos <i>Blood Vessels</i>	Válvulas Cardíacas <i>Cardiac tissue</i>	Tecido Músculo-esquelético <i>Musculoskeletal</i>
Portugal <i>Portugal</i>	48,91	9,59	17,87	1,69	4,42
Espanha <i>Spain</i>	77,33	1,06	5,11	4,93	47,93
França <i>France</i>	75,56	ND	4,28	2,27	0,92
Itália <i>Italy</i>	112,29	3,77	13,87	3,29	50,31
Alemanha <i>Germany</i>	79,71	5,7	0,19	2,13	68,80
Taxa média europeia <i>European average rate</i>	38,51	7,30	6,18	5,28	58,77

Figura 14 – Dados Europeus da colheita de tecidos de 2010. Portugal está abaixo das médias europeias no que toca à colheita de tecidos, sendo o país com menos colheita de válvulas cardíacas (in [13]).

2. Evolução da Transplantação cardíaca em Portugal

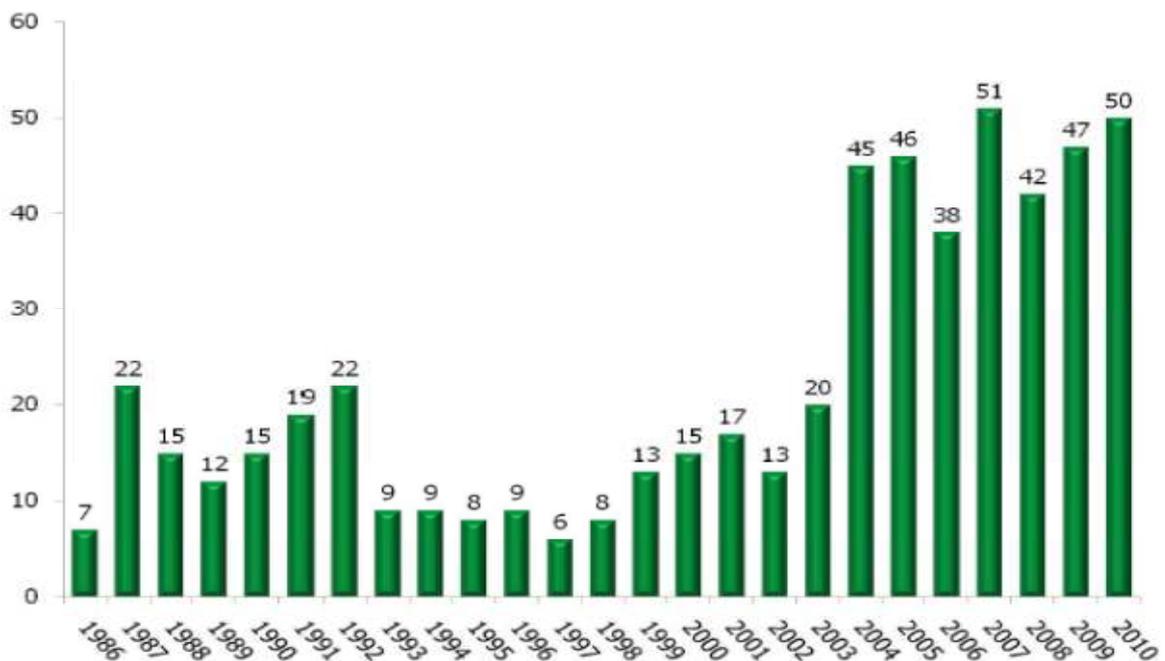


Figura 15 - Evolução da Transplantação cardíaca em Portugal. A transplantação cardíaca em Portugal aumentou 6,4% em 2010, com um total de 558 transplantes cardíacos (in [13]).

3. Células Estaminais

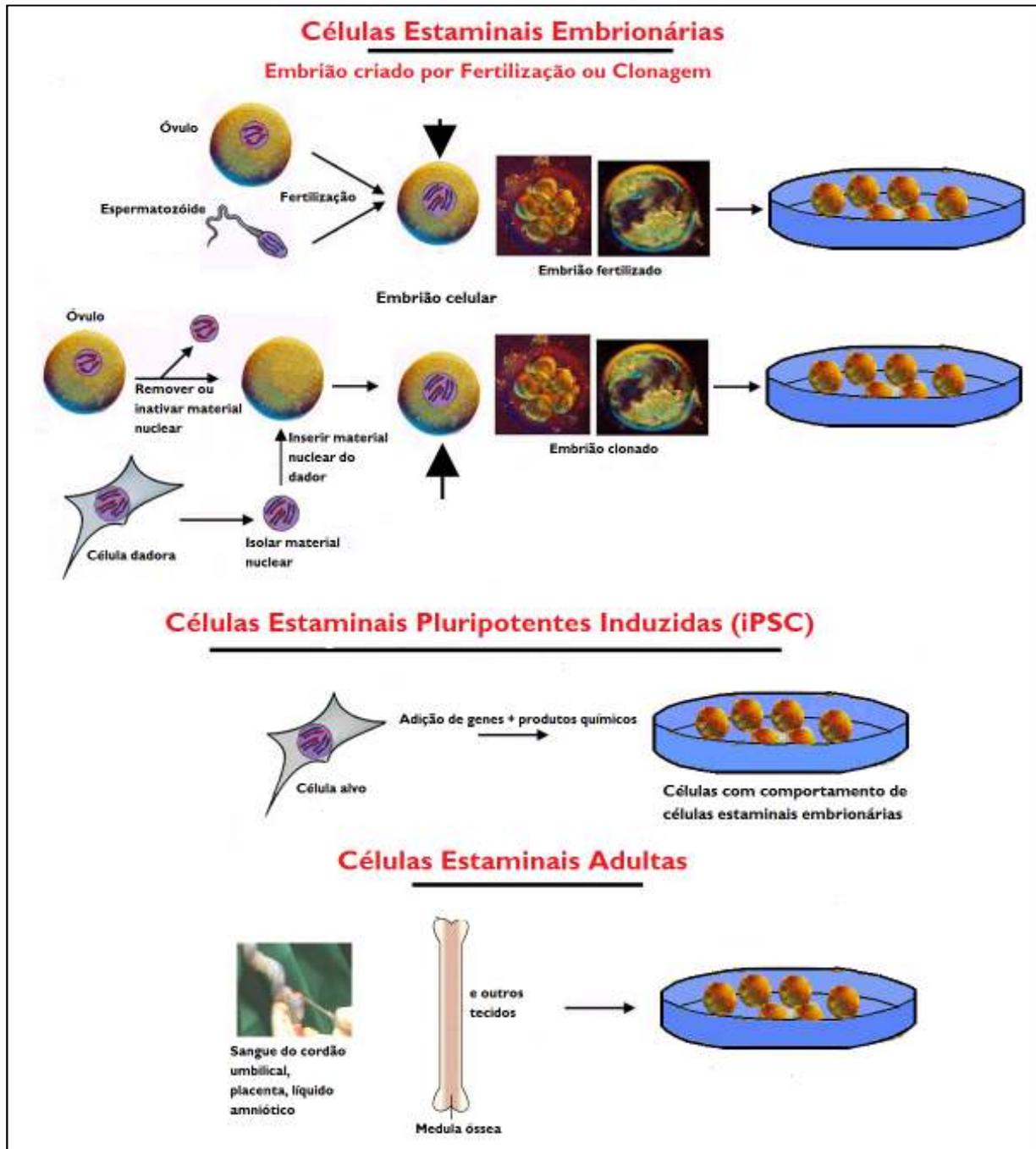


Figura 16 – Células Estaminais Embrionárias, Adultas e Pluripotentes Induzidas – Origem e obtenção das células estaminais. Células estaminais embrionárias obtidas através de fertilização ou clonagem, com a formação de embrião. Células estaminais adultas obtidas de tecidos adultos (diferenciados). E células pluripotentes induzidas (iPSC) obtidas a partir de células diferenciadas com adição de genes e produtos químicos, levando-as a ter comportamento de células estaminais embrionárias [14].

4. Origem e Fonte das Células Estaminais

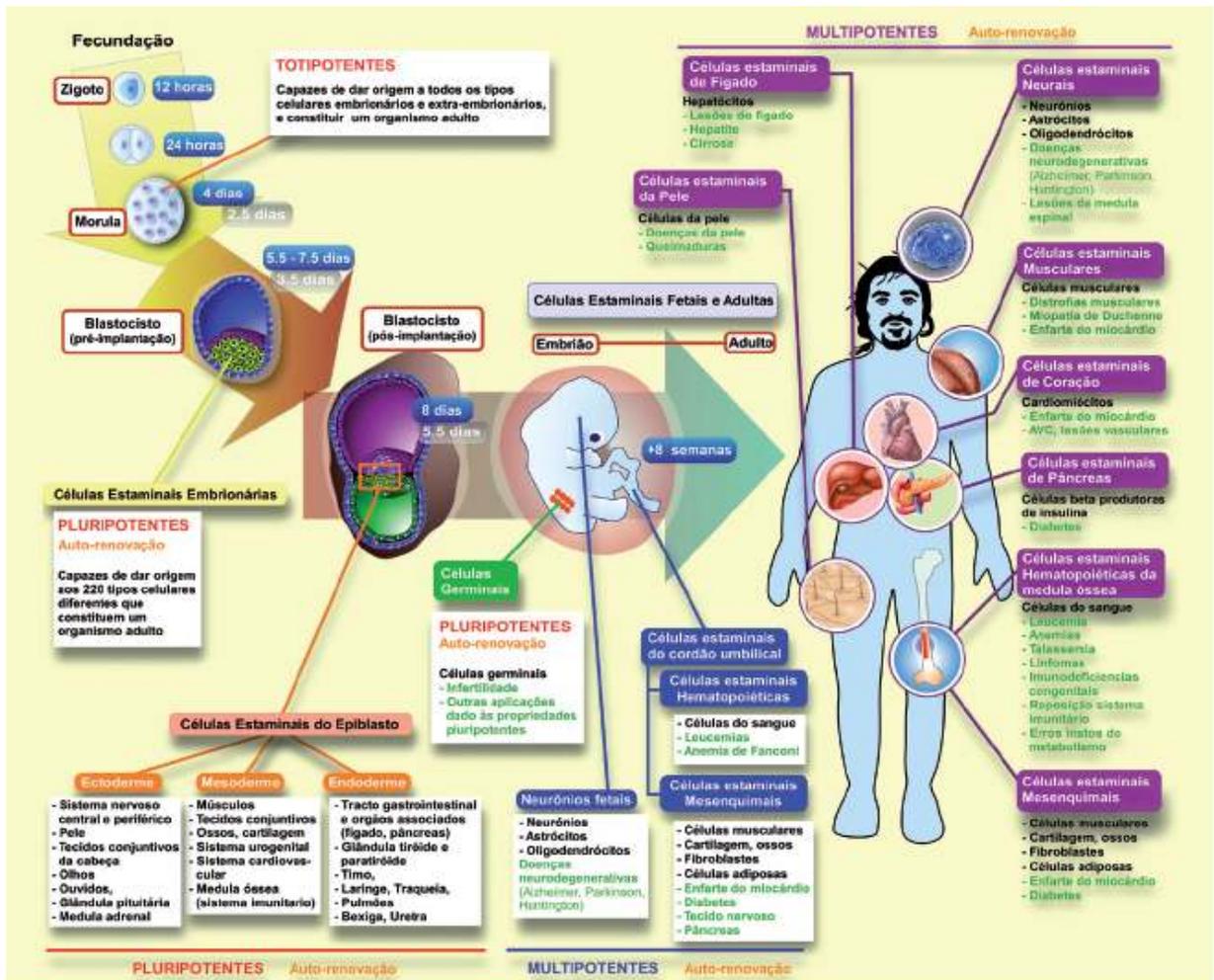


Figura 17 – Fonte de células estaminais embrionárias e adultas. Após a fecundação, as células da massa celular do blastocisto pré-implantado podem ser isoladas e cultivadas *in vitro*, dando origem a células estaminais embrionárias com capacidade de se auto-renovarem (células pluripotentes). Após implantação, células isoladas de blastocisto (células estaminais de epiblasto) são igualmente pluripotentes podendo dar origem a células de 3 camadas germinativas, apesar de terem capacidade restrita de diferenciação, em relação às CEE. A partir do embrião podem obter-se células germinais, também pluripotentes, e ainda células estaminais do cordão umbilical, hematopoiéticas e mesenquimais. Vários tecidos do organismo adulto contêm células imaturas (células estaminais adultas ou somáticas) que permitem a reposição das células perdidas por morte natural do tecido ou lesão. (Fonte: Adaptado de Bragança *et al.*, 2010)

BIBLIOGRAFIA

- ASSIS, O. [et.al] (2003) – Filmes Comestíveis de Quitosana. “Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento” 6 (30) (2003) 33-38
- BRAGANA, J. [et.al] (2010) – Células estaminais e medicina regenerativa, Um admirável mundo novo. “CanbalBQ” 7 (2010) 4-17
- CRIBIER, A. [et.al] (2002) – Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. “Circulation” 106 (24) (2002) 3006-8
- DASI, L. [et.al] (2009) – Fluid mechanics of artificial heart valves. “Clinical experimental pharmacology & physiology” 36 (2) (2009) 225-237
- DOHMEN, O. [et.al] (2009) – Tissue-Engineered Heart Valve Scaffolds. “Annals of Thoracic Cardiovascular Surgery” 15 (6) (2009) 362-367
- DOHMEN, P. (2012) – Clinical results of implanted tissue engineered heart valves. “HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular Anesthesia” 4 (4) (2012) 225-231
- EDWARDS, S. [et.al] (2004) – Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. “Research Journal” 4 (2) (2004) 86-94
- EMMERT, M. (2012) – Stem Cell-Based Transcatheter – Aortic valve Implantation. “JACC. Cardiovascular Interventions” 5 (8) (2012) 874-883
- FILOVÁ, E. [et.al] (2009) – Tissue-Engineered Heart valves. “Physiological reserach” 58/supply 2 (2009) S141-S158
- FÖLDES, G. [et.al] (2011) – 5.32-Stem cell Therapy to Treat Heart Failure. “Comprehensive Biotechnology (Second Edition)” 5 (2011) 407-423
- FRAGATA, J. [et.al] (2002) – Operação de Ross-Como minimizar os efeitos da curva da aprendizagem. “Revista Portuguesa da Cirurgia Cardio-Torácica e Vascular” XI (1) (2002) 11-15
- GARBERN, J. [et.al] (2013) – Cardiac Stem cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration. “Cell Stem Cell” 12 (6) (2013) 689-698
- GHANBARI, H. [et.al] (2009) – Polymeric heart valves: new materials, emerging hopes. “Trends in Biotechnology” 27 (6) (2009) 359-367
- GOTT, V. [et.al] (2003) – Mechanical heart valves - 50 years of evolution. “Annals of Thoracic Surgery” 76 (2003) S2230-S2239
- HANSSON, E. [et.al] (2009) – Regeneration Next: Toward Heart Stem Cell Therapeutics. “Cell Stem cell” 5 (4) (2009) 364-377
- HUTMACHER, D. W. (2001) – Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives. “Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.” 12 (1) (2001) 107-124
- JUNIOR, A. [et.al] (2007) – Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. “Polímeros: Ciência e Tecnologia” 17 (4) (2007) 308-317
- KIM, M. S. [et.al] (2011) – Polymeric scaffolds for Regenerative medicine. “Polymer Review” 51 (1) (2011) 23-52

- LI, Y. [et.al] (2001) – Effects of Three-dimensional Scaffolds on Cell Organization and Tissue Development. “Biotechnology and Bioprocess Engineering” 6 (5) (2001) 311-325
- MOL, A. [et.al] (2009) – Tissue engineered of heart valves: advances and current challenges. “Expert Review of Medical Devices” 6 (3) (2009) 259-275
- NAVARRO, F. [et.al] (2010) – Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados: estudo experimental em ovinos. “Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular” 25 (3) (2010) 377-387
- RADOSLAW, A. [et.al] (2012) – Tissue-Engineered Heart valve: Future of Cardiac Surgery. “World Journal of Surgery” 36 (7) (2012) 1582-1591
- ROSA, D. [et.al] (2000) – Propriedades e Biodegradabilidade de PCL e PHB em Pool de Fungos. “Revista da Ciência e Tecnologia” 15 (8) (2000) 75-80
- SEWELL-FOFTIN, M. (2011) – EMT-inducing biomaterials for heart valves engineering: taking cues from development biology. “Journal of Cardiovascular Translation Research” 4 (5) (2011) 658-671
- SIMIONESCU, A. [et.al] (2011) – Inflammation in Cardiovascular Tissue Engineering: The Challenge to a Promise: A Minireview. “International Journal of Inflammation” 2011 (2011), 11 pages
- SODIAN, R. [et.al] (2006) – Tissue Engineering of Autologous Human Heart Valves Using Cryopreserved Vascular Umbilical Cord Cells. “The Annals of Thoracic Surgery” 81 (6) (2006) 2207-2216
- SYEDAIN, Z. [et.al] (2013) – Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential. “Tissue Engineering Part A” 19 (5-6) (2013) 759-769
- VESELY, I. (2005) – Heart valve tissue engineering. “Circulation Research” 97 (8) (2005)
- WEBER, B. [et.al] (2012) – Stem cells for heart valve regeneration. “Swiss medical Weekly” 142 (2012) 1-11
- YU, T. [et.al] (2013) – In Vivo Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. “Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society” 77 (5) 1297-1306

SITES:

- [1] www.who.int/cardiovascular_diseases/en/ (Acedido a 23 de Janeiro de 2013)
- [2] <http://hmsportugal.wordpress.com/2011/10/26/o-que-sao-problemas-das-valvulas-cardiacas/> (Acedido a 25 de Maio de 2013)
- [3] <http://www.cfcpc.com.br/a/index.asp?n=23739&lg=pt> (Acedido a 25 de Maio de 2013)
- [4] <http://www.bhf.org.uk/heart-health/treatment/valve-heart-surgery.aspx> (Acedido a 29 de Junho de 2013)
- [5] <http://www.kidshearts.com/body.cfm?xyzpdqabc=0&id=38&action=detail&AEArticleID=9380>

&AEProductID=Adam2004_102&AEProjectTypeIDURL=APT_6 (Acedido a 25 de Maio de 2013)

[6] <http://www.drmarcelonogueira.med.br/manuais/VALVULAS.htm> (Acedido a 25 de Maio de 2013)

[7] <http://www.cardioatrio.com/index.php/component/content/article/33-contenidos-generales/hitos-en-cardiologia/2801-inicio-y-desarrollo-de-las-valvulas-cardiacas-proteticas> (Acedido a 25 de Maio de 2013)

[8] http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_978-1-4419-7350-4_12-0 (Acedido a 26 de Abril de 2013)

[9] http://www.3dbiotekstore.com/index.php?main_page=index&cPath=10 (Acedido a 21 de Agosto de 2013)

[10] <http://www.cytothera.pt/pt/Informa%C3%A7%C3%A3oCient%C3%ADfica/AsC%C3%A9lulasEstaminais.aspx> (Acedido a 15 de Agosto de 2013)

[11] <http://cienciadiaria.com.br/2010/03/08/novo-metodo-utiliza-celulas-endoteliais-para-aumentar-producao-de-celulas-tronco/#respond> (Acedido a 15 de Agosto de 2013)

[12] <http://cel-est.blogspot.pt/2011/04/celulas-estaminais-pluripotentes.html> (Acedido a 5 de Setembro de 2013)

[13] http://www.asst.min-saude.pt/SiteCollectionDocuments/relatorio_2010.pdf (Acedido a 25 de Maio de 2013)

[14] <http://pt.wikinoticia.com/Tecnologia/geral%20tecnologia/127927-premio-nobel-de-medicina-2012-as-celulas-tronco-pluripotentes-induzidas> (Acedido a 5 de Setembro de 2013)