

Rui Pedro Cachada Freitas

BIOMATERIAIS E A SUA APLICAÇÃO NA REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO DO TECIDO CARDIOVASCULAR

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Manuel Martins Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Rui Pedro Cachada Freitas

BIOMATERIAIS E A SUA APLICAÇÃO NA REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO DO TECIDO CARDIOVASCULAR

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Manuel Martins Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O ORIENTADOR

(Prof. João Manuel Martins Leitão)

O ALUNO

(Rui Pedro Cachada Freitas)

Eu, Rui Pedro Cachada Freitas, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010126601, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016

(Rui Pedro Cachada Freitas)



«Chega o fim, o momento, de um último olhar...»

in Balada do Amanhecer

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Manuel Martins Leitão, por me ter aceitado como seu orientando, por toda a sua disponibilidade, partilha de conhecimento e orientação que foi fulcral para que pudesse realizar esta monografia.

Aos meu pais e irmãos por todo o seu apoio desde o início deste desafio, pela sua compreensão e paciência nos muitos momentos de indisponibilidade ao longo destes 6 anos e por todo o amor e carinho que sempre souberam transmitir em qualquer altura do meu percurso.

À Joana, por toda a força que sempre me transmitiu, por todo o seu apoio e por toda a sua paciência e bondade.

À *Estudantina Universitária de Coimbra* por ter permitido complementar a minha passagem por Coimbra com atividades de cultura, música e boa amizade em todos os momentos que me proporcionou.

Ao *Grupo de Fado Amanhecer* por me ter demonstrado que ainda existem grandes projetos culturais na cidade de Coimbra, por terem tornado possível deixar nossa marca na Canção de Coimbra e por terem sido exemplo de dedicação e trabalho na criação e evolução deste grupo.

À cidade de Coimbra, por todos os bons momentos e fantásticas amizades que me proporcionou ao longo deste percurso.

RESUMO

As doenças cardiovasculares assumem atualmente uma das principais causas de mortalidade e morbidade em Portugal, constituindo mesmo cerca de 25% da mortalidade a nível mundial. À medida que esta prevalência tende a aumentar torna-se necessário acompanhar esta evolução e desenvolver novas abordagens terapêuticas para que seja possível diminuir o seu impacto no nível de saúde mundial. No que diz a novas perspectivas terapêuticas e regenerativas, os biomateriais, naturais ou sintéticos, surgem como uma abordagem promissora e exibem um grande potencial na reparação e regeneração do tecido cardiovascular. Como tal, têm sido investigados vários tipos de formulações que incluem a utilização tanto de proteínas como células devido ao seu potencial terapêutico para aplicação nas várias doenças cardiovasculares, com maior ênfase para o enfarte agudo do miocárdio.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases assume nowadays one of the major causes for mortality and morbidity in Portugal, representing about 25% of all deaths worldwide. Considering the increasing prevalence of these diseases it's necessary that this evolution is accompanied with the development of new therapeutic approaches in order to diminish their impact on public health worldwide. Regarding new regenerative and therapeutic perspectives, natural or synthetic biomaterials appear as promising approaches and exhibit great potential in repairing and regenerating the damaged cardiovascular tissue. Consequently, several kinds of formulations that include the utilization of proteins or cells are being investigated due to their therapeutic potential and application for cardiovascular diseases, with greater focus on acute myocardial infarction.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. BIOMATERIAIS E AS SUAS APLICAÇÕES	5
2.1 - CLASSIFICAÇÃO DE BIOMATERIAIS	6
2.2 - BIOMATERIAIS DE ORIGEM SINTÉTICA	7
2.3 - BIOMATERIAIS DE ORIGEM NATURAL	8
2.4 - MODULAÇÃO DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO AO BIOMATERIAL.....	9
3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TERAPÊUTICA	10
4. BIOMATERIAIS E O TECIDO CARDIOVASCULAR	11
4.1 - BIOMATERIAIS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS.....	11
4.1.1 - ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO.....	11
4.1.2 - BLOQUEIO ATRIOVENTRICULAR (AV).....	12
4.2 - BIOMATERIAIS COMO AGENTES DE SUPORTE	12
4.2.1 - HIDROGÉIS.....	13
4.2.2 - NANOFIBRAS	15
4.3 - BIOMATERIAIS COMO TRANSPORTADORES	17
4.3.1 - NANO E MICROPARTÍCULAS.....	17
4.3.2 - LIPOSSOMAS.....	18
5. PERSPETIVAS FUTURAS DE DESENVOLVIMENTO	21
6. CONCLUSÃO	22
7. BIBLIOGRAFIA.....	23

ABREVIATURAS

3D - Tridimensional

AV - Atrioventricular

BMSC - Células Estaminais da Medula Óssea (*Bone Marrow Stem Cells*)

DDDA - Ácido Dodecanodioico

DDS - Sistema de Libertação de Fármacos (*Drug Delivery Systems*)

EAM - Enfarte Agudo do Miocárdio

ECM - Matriz Extracelular

FCEV - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

FCF - Fator de Crescimento Fibroblástico

IGF-I - Fator de Crescimento Similar à Insulina

IL - Imunolipossomas

PEG - Polietilenoglicol

PGA - Ácido poliglicólico

PGLA - Poli(Acido Láctico-co-Glicólico)

PLA - Ácido Poliláctico

PVA - Álcool Polivinílico

PVP - Polivinilpirrolidona

I. INTRODUÇÃO

Com o avanço da medicina moderna e do conhecimento tecnológico e científico, das diferentes abordagens terapêuticas disponíveis atualmente, a biotecnologia surge naturalmente como um ramo que tem permitido uma evolução constante a nível dos métodos diferenciais de diagnóstico e terapêutica.

Dentro da biotecnologia, a área dedicada aos biomateriais tem tido um papel fulcral na produção de dispositivos médicos inovadores e no desenvolvimento da engenharia de tecidos, promovendo a reparação e regeneração das propriedades e funcionalidade dos mesmos quando, numa situação normal, esta não seria possível. São assim componentes essenciais para a reparação de tecidos, órgãos ou mesmo mecanismos fisiológicos que apresentam a sua funcionalidade natural afetada pelas mais variadas razões possíveis. Considerando a capacidade limitada do corpo humano em regenerar a maioria dos seus tecidos e órgãos, a engenharia de tecidos associada à medicina regenerativa ambicionam o desenvolvimento de sistemas capazes de substituir, reparar ou estimular a capacidade natural de regeneração do corpo humano. (Chen e Liu, 2016)

Os avanços na compreensão deste tipo de sistemas aliados à reparação e regeneração de tecidos tem permitido a colmatação de algumas lacunas da transplantação tradicional de tecidos tal como a rejeição dos excertos transplantados e exageradas reações inflamatórias associadas a este processo. A utilização de biomateriais visa assim uma maior compatibilidade do material utilizado com o ambiente no qual é colocado através da utilização de materiais que sejam capazes de mimetizar os aspetos críticos, tanto físicos como químicos, da estrutura original que foi danificada promovendo assim a sua reparação e regeneração. (Chen e Liu, 2016)

2. BIOMATERIAIS E AS SUAS APLICAÇÕES

Segundo o *American National Institute of Health* (ANIH), biomaterial define-se como: "qualquer substância ou combinação de substâncias, que não fármacos, sintéticos ou naturais, que podem ser utilizados por qualquer período de tempo e que aumenta ou substitui parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou funcionalidade, por forma a manter ou melhorar a qualidade de vida de um determinado indivíduo". (Zavaglia e Prado da Silva, 2016)

Tendo sido utilizados durante muitos séculos, nomeadamente no implante de lentes intraoculares e na restauração dentária, os biomateriais adquirem cada vez mais uma participação indispensável no campo da engenharia de tecidos, principalmente com a evolução dos conhecimentos da biologia celular e molecular, química e engenharia de materiais que tem permitido a sua utilização numa perspetiva clínica mais abrangente. (Keane e Badylak, 2014)

Na generalidade, um biomaterial engloba qualquer substância capaz de interagir com um sistema biológico por forma a reparar ou substituir esse tecido danificado e pode exercer a função de suporte, matriz ou até estimular o crescimento de novo tecido no local da lesão. (Zavaglia e Prado da Silva, 2016)

Devido à baixa capacidade de regeneração de certos tecidos e órgãos ou até mesmo devido ao efeito negativo dos processos inflamatórios na reparação de tecido danificado uma potencial opção terapêutica envolve a utilização destes biomateriais por forma a criar uma combinação harmoniosa entre estes materiais e a matriz extracelular presente no local danificado e que seja possível reproduzir e, em certa extensão, imitar a complexidade tecidual por forma a assistir na sua reparação e regeneração. Esta é assim a principal aplicação terapêutica onde tecidos criados através de engenharia podem integrar totalmente o corpo humano e fornecer assim uma cura permanente para várias doenças que se encontram até ao momento sem qualquer cura possível. (Chen e Liu, 2016)

Considera-se importante referir a existência de três gerações de biomateriais, que se foram alterando ao longo dos anos com o desenvolvimento de novas tecnologias: uma primeira geração na qual a utilização de biomateriais se centrava nas suas características inertes e na isenção de toxicidade; uma segunda geração que abordava os biomateriais de uma perspetiva de bioatividade e capacidade de reabsorção; e uma terceira geração na qual se utiliza os biomateriais como meio para promover a regeneração do tecido e potenciar os mecanismos naturais de regeneração do hospedeiro. (Zavaglia e Prado da Silva, 2016)

A perspectiva atual na aplicação de biomateriais envolve o seu papel como materiais utilizados para a criação de uma estrutura que seja capaz de suportar mecanicamente e encorajar a adesão, proliferação e diferenciação celular e controlar o tamanho e forma do tecido regenerado. A criação destas matrizes visa que a estrutura implantada seja apenas temporária sendo que ao longo do tempo esta se vai degradando ou sendo reabsorvida de forma controlada e de acordo com a taxa de crescimento do novo tecido, fornecendo suporte para o seu crescimento e, na maioria dos casos, modulando fisiologicamente a resposta celular através de estímulos celulares capazes de alterar o comportamento e função celular. (Chen e Liu, 2016)

Apesar da utilidade destes biomateriais, a sua utilização é bastante limitada quando utilizados isoladamente para efeitos de regeneração de tecido, processo que envolve migração, proliferação e diferenciação celular. Para tal, é necessário a inclusão de fatores de crescimento celular e a modulação da distribuição espacial e temporal dos mesmos. Com a associação destes fatores de crescimento ou dos seus derivados peptídicos ao biomaterial torna-se assim possível obter os processos de regeneração tecidual, tal como proliferação e migração celular, regeneração nervosa, osteogénese e angiogénese em tecidos em isquemia. (Keane e Badylak, 2014)

2.1 - CLASSIFICAÇÃO DE BIOMATERIAIS

É possível classificar os biomateriais em quatro principais classes de material, sendo estas, as cerâmicas, os metais, os polímeros e os compósitos, variando entre estes a bioatividade e biofuncionalidade de cada um. (Zavaglia e Prado da Silva, 2016)

Tabela I - Tipos de biomateriais: exemplos e as suas aplicações (Chen e Liu, 2016).

Biomaterial	Exemplo	Aplicações
Cerâmicas	Argilas, Vidros	Ossos, dentes, válvulas e tendões
Metais	Ferro, Cobre, Alumínio	Fixação ortopédica, placas, implantes dentários
Polímeros	PGA, PVA, PVP, PEG	Suturas, artérias, veias, tendões, oftalmologia
Compósitos	Resina	Válvulas cardíacas artificiais e cartilagens

PGA - Ácido Poliglicólico; **PVA** - Álcool Polivinílico; **PVP** - Polivinilpirrolidona **PEG** - Propililenoglicol

Os biomateriais são também classificados em duas categorias de acordo com a sua origem, podendo esta ser natural ou sintética. (Chen e Liu, 2016; Keane e Badylak, 2014)

2.2 - BIOMATERIAIS DE ORIGEM SINTÉTICA

A utilização de biomateriais sintéticos apresenta algumas vantagens em relação aos biomateriais de origem natural devido à facilidade em controlar a sua forma, arquitetura e química de maneira a dar origem a diversas alternativas de composição para que na sua forma final se adapte completamente à região na qual vai ser aplicado, exercendo uma função e atividade controlada e desejada.

Os biomateriais sintéticos mais utilizados para regeneração baseiam-se em α -hidroxiácidos, tal como o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e o seu copolímero, o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PGLA). Considera-se que estes biomateriais dão origem a produtos de degradação não-tóxicos, o ácido láctico e o ácido glicólico, através de hidrólise simples dos polímeros utilizados e depois eliminados pelas vias fisiológicas normais. Esta reação de degradação surge também como uma vantagem uma vez que a hidrólise química pode ser mais facilmente prevista e controlada que uma reação dependente de enzimas. (Chen e Liu, 2016)

A fácil modulação das suas propriedades físicas torna-se uma grande vantagem dos biomateriais de origem sintética uma vez que é possível, através de micro e nano tecnologias, a produção de padrões detalhados na sua superfície, bem como alterar a sua forma e propriedades mecânicas. Estas características físicas têm sido ligadas à modulação de alguns processos celulares, tal como descritos seguidamente:

Forma - a forma das partículas podem influenciar através do contacto inicial com macrófagos se este inicia o processo de fagocitose ou não.

Tamanho - o tamanho das partículas tem demonstrado influência sobre as células e determina se as mesmas entram em processo de apoptose ou em processo de diferenciação.

As propriedades mecânicas parecem também ter grande influência na morfogénese tecidual, apresentando uma profunda influência no comportamento celular. A alteração de elasticidade do substrato no qual foram cultivadas células mesenquimais pode facilitar a sua diferenciação em células com função neuronal, óssea ou muscular. Foi ainda demonstrado que estas propriedades mecânicas podem influenciar reações imunes tal como fagocitose por parte de macrófagos ou mesmo a ativação de células dendríticas. (Keane e Badylak, 2014)

2.3 - BIOMATERIAIS DE ORIGEM NATURAL

Os biomateriais de origem natural constituem uma parte essencial da engenharia de tecidos devido à sua bioatividade, biocompatibilidade, capacidade de degradação e, sobretudo, semelhança dos seus constituintes com a matriz extracelular (ECM) do tecido lesado. Este tipo de biomateriais apresenta também vantagens como: habilidade natural para serem reconhecidos biologicamente; não libertarem qualquer produto citotóxico durante a sua degradação; e a possibilidade de ajustabilidade a sua degradação através da alteração da sua formulação ou condições de processamento. (Chen e Liu, 2016)

Este tipo de biomateriais pode ainda ser dividido em dois grupos distintos de acordo com a sua constituição:

Biomateriais de base proteica - são obtidos a partir de fontes animais ou humanas e incluem moléculas que imitam o ambiente extracelular, como por exemplo, o colagénio, a seda, a gelatina, a fibronectina, a queratina e a fibrina.

Biomateriais de base polissacarídica - são maioritariamente obtidos a partir de fontes de algas ou microbianas e incluem o hialuronato, a celulose, a glucose, o alginato, a condroitina, a quitina e o quitosano.

Outra fonte de obtenção deste tipo de materiais é através da descélularização de tecido de origem animal, ou seja, a eliminação de todo o material de natureza celular e nuclear presente em tecidos/órgãos de origem humana, tal como, por exemplo, a derme, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, mucosa intestinal, entre outros. Os componentes que são obtidos através deste processo podem ser tanto orgânicos como inorgânicos e podem ser utilizados na construção de estruturas de suporte por forma a criar uma melhor simulação da matriz extracelular de um certo tecido. (Chen e Liu, 2016; Keane e Badylak, 2014)

Apesar da utilização deste tipo de biomaterial apresentar muitas vantagens, nomeadamente na compatibilidade da matriz extracelular do excerto com a do tecido lesado, apresenta também algumas desvantagens, tal como a sua fraca força mecânica e a inconsistência na sua composição e propriedades químicas. (Chen e Liu, 2016)

2.4 - MODULAÇÃO DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO AO BIOMATERIAL

A resposta ao tecido lesionado ocorre em quatro fases: hemóstase, inflamação, proliferação e remodelação. A típica resposta final a todas estas fases geralmente culmina na formação de tecido cicatrizado, sem qualquer função diferenciada. A abordagem da engenharia de tecidos passa então por evitar a formação deste tipo de tecido e promover a formação de tecido funcional (remodelação construtiva), através de alterações da resposta imune do hospedeiro.

O processo inflamatório é majoritariamente mediado por macrófagos que participam em partes essenciais do processo regenerativo tecidual, podendo adotar variados fenótipos conforme os estímulos químicos e físicos presentes na matriz extracelular. De todos os fenótipos é essencial destacar o papel pró-inflamatório do fenótipo M1 e o papel pro-remodelador do fenótipo M2. Estas diferenças de fenótipo demonstraram que a estimulação seletiva do tipo de macrófago desejado influencia diretamente o resultado final de cicatrização tecidual.

A transição para uma predominância de macrófagos com fenótipo M2 permite obter dois resultados diferentes: formação de tecido cicatrizado ou formação de tecido funcional. A obtenção de um ou de outro é diretamente dependente da altura de transição entre os dois fenótipos, sendo que quanto mais cedo for esta transição maior será a extensão da reconstrução de tecido funcional.

Exemplo da indução desta transição é a utilização de estruturas compostas de biomateriais naturais tal como colagénio e ácido hialurónico altamente sulfatado, as quais estimulam uma maior transição do fenótipo M1 para M2.

Apesar desta transformação de fenótipo ser essencial, para promover a regeneração total é necessário também a mobilização de células progenitoras/estaminais para o local de regeneração, o qual pode ser obtido através de fatores ambientais tal como citocinas secretadas por macrófagos ou mesmo através dos produtos de degradação dos biomateriais.

3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E TERAPÊUTICA

As doenças cardiovasculares constituem a maior causa de morbidade e mortalidade a nível mundial e representam uma condição que afeta significativamente a qualidade de vida. Apesar da intervenção farmacológica e cirúrgica melhorar consideravelmente esta qualidade de vida não há, de momento, nenhuma cura efetiva para as principais doenças cardiovasculares, tal como o enfarte do miocárdio e arritmias, devido à fraca capacidade do coração de se reparar e regenerar. (Cui, Yang e Li, 2016)

Apesar das taxas de sobrevivência em doentes afetados por estas patologias estar a aumentar devido a melhorias nos cuidados de saúde e na prevenção secundária, a verdadeira recuperação do indivíduo depende da rápida restauração do fluxo sanguíneo e da função cardíaca. A falha desta restauração pode então levar a que o miocárdio não se consiga recuperar e que se desenvolva um quadro de falência cardíaca crónica. (Cicha *et al.*, 2016)

Por forma a colmatar alguma ineficácia da terapêutica farmacológica em promover a completa recuperação e regeneração do tecido cardiovascular e através da evolução da bioengenharia e compreensão das patologias cardiovasculares tem sido possível aos investigadores aproximarem-se de abordagens terapêuticas com melhores propriedades regenerativas. Esta abordagem foca-se na utilização de novos materiais biofuncionais, estruturais ou com função de transporte que permitirão a substituição da intervenção farmacológica ou até mesmo a complementação e maximização dos resultados positivos da mesma, visando assim a total reparação do tecido cardiovascular afetado e recuperação do doente cardiovascular. (Cicha *et al.*, 2016)

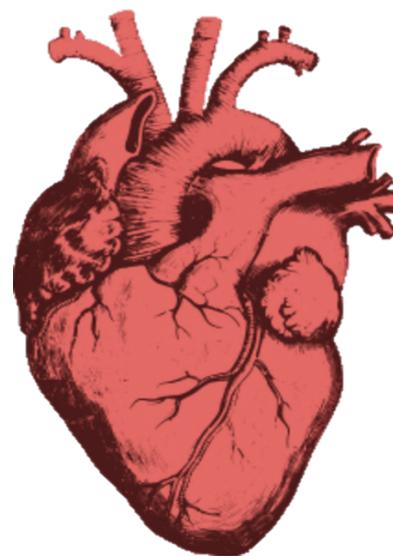


Figura I - Coração Humano.

4. BIOMATERIAIS E O TECIDO CARDIOVASCULAR

Apesar de todas as abordagens terapêuticas utilizadas na atualidade, a cura para as doenças cardiovasculares é inexistente considerando a capacidade limitada do tecido cardiovascular para se regenerar. Doenças cardiovasculares tal como o enfarte do miocárdio e arritmias podem ser compensadas através de terapia farmacológica, cirurgia cardiovascular ou dispositivos de assistência ventricular, melhorando apenas a qualidade de vida e prolongando a longevidade do doente sem que seja obtida realmente a regeneração total do tecido ou órgão. Como tal, novas perspectivas com melhor eficácia e menor custo são necessárias para que seja possível obter uma abordagem terapêutica com maior extensão de reparação e vantagem a longo prazo. (Cui, Yang e Li, 2016)

Incluídos em novas abordagens terapêuticas estão os biomateriais, podendo estes ser utilizados como agente terapêutico ou então funcionar como suporte ou transportador de células e fatores de crescimento para o tecido cardiovascular. (Cui, Yang e Li, 2016)

4.1 - BIOMATERIAIS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS

Por forma a que seja possível utilizar um biomaterial na reparação e regeneração do tecido cardiovascular é necessário que este apresente algumas características, tal como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, biofuncionalidade e baixa ou nenhuma toxicidade. (Cui, Yang e Li, 2016)

Apesar da sua maior utilização como estruturas de suporte celular e molecular, os biomateriais podem possuir também biofuncionalidade própria, permitindo a sua interação com as células e tecidos e o desencadeamento de modificações fisiológicas.

4.1.1 - ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO

O alginato, um polissacarídeo derivado de algas, tem sido extensivamente investigado para utilização como biomaterial natural para aplicações na regeneração e engenharia de tecidos e libertação de fármacos. Uma dessas investigações que visou explorar os efeitos da injeção de um hidrogel composto de alginato chegou à conclusão que em 6 semanas, o hidrogel injetado foi completamente absorvido e substituído por tecido conjuntivo. Foi também eficaz no reforço da espessura do tecido cicatrizado, na atenuação da dilatação

ventricular adversa e melhoria geral das funções cardíacas, seja este injetado 7 ou 60 dias após EAM (Enfarte Agudo do Miocárdio). (Cui, Yang e Li, 2016)

4.1.2 - BLOQUEIO ATRIOVENTRICULAR (AV)

O bloqueio atrioventricular consiste numa doença de condução que ocorre quando o sinal elétrico dos átrios é parcialmente ou completamente bloqueado pelo nodo AV causando uma diminuição rítmica do ventrículo correspondente. Este tipo de patologias condutivas podem beneficiar da utilização de biomateriais condutivos, ou seja, polímeros com capacidade de condução elétrica. As suas propriedades condutivas advém da sua estrutura na qual é possível observar ligações simples alternadas por ligações duplas, o que permite que os eletrões se movimentem livremente, conduzindo o impulso elétrico.

Os polímeros condutivos são assim excelentes candidatos para serem utilizados como matrizes extracelulares no suporte de células e na manutenção das conexões elétricas do coração, podendo mesmo até dar origem ao primeiro pacemaker biológico para ser utilizado em situações de anomalias condutivas. (Cui, Yang e Li, 2016)

4.2 - BIOMATERIAIS COMO AGENTES DE SUPORTE

A utilização de biomateriais como agentes de suporte para o crescimento, integração e desenvolvimento de células cruciais para o processo de reparação e regeneração do tecido cardiovascular é uma prática já bem definida e que tem sido utilizada em inúmeros estudos com o intuito de explorar a sua utilização e benefícios que esta pode trazer para o processo regenerativo.

As vantagens desta utilização de biomateriais baseia-se no ambiente tridimensional (3D) que são capazes de criar através das suas propriedades mecânicas específicas e também através da sua influência, por sinalização celular, nas células integradas na sua estrutura. Esta propriedade dos biomateriais é conhecida como *scaffolding* e para a construção destas estruturas de suporte é importante ter em consideração fatores como a sua forma, tamanho e as suas propriedades físicas e mecânicas. (Pascual-Gil et al., 2015)

Para além da sua função de suporte celular, estruturas construídas através dos biomateriais podem também ser utilizadas como sistemas de libertação de fármacos (*Drug Delivery Systems*) capazes de os proteger da biodegradação e controlar a sua administração em casos que seja necessária uma libertação prolongada. Esta libertação prolongada permite

que não seja necessária a administração de grandes quantidades de moléculas evitando-se assim possíveis efeitos adversos. Para tal, devido às propriedades físico-químicas de cada biomaterial, é necessário escolher aquele que se adequará melhor para o efeito pretendido. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

De entre as várias estruturas possíveis com a aplicação de biomateriais, destacam-se duas que apresentam maior utilização: os hidrogéis e as nanofibras.

4.2.1 - HIDROGÉIS

Os hidrogéis consistem numa rede tridimensional de polímeros e copolímeros que aumentam de tamanho em contacto com a água e, pelas suas propriedades específicas, representam um sistema de libertação importante na reparação de tecido cardiovascular. A sua relevância vem da sua capacidade de imitar a matriz extracelular e reproduzir um ambiente familiar ao desenvolvimento celular, para além da possibilidade de serem administrados por técnicas não-invasivas. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

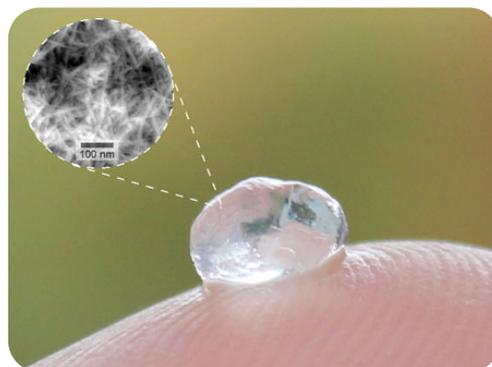


Figura 2 – Hidrogel.

A evolução dos biomateriais sintéticos tem permitido a obtenção de hidrogéis com um elevado grau de biocompatibilidade e biodegradação que permitem obter benefícios em situações de enfarte do miocárdio, tal como: a promoção de formação de tecido muscular liso; prevenção de danificação ventricular e expansão da cicatriz; e melhoria da função cardíaca geral. Nestes casos, estudos tem demonstrado que os resultados obtidos da injeção de hidrogéis varia consideravelmente consoante a altura em que são administrados sendo que os resultados mais positivos são obtidos uma semana após a ocorrência do enfarte. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

4.2.1.1 - TERAPIAS CELULARES

Tal como referido anteriormente, a capacidade dos hidrogéis de reproduzir um ambiente similar ao existente na matriz extracelular cardíaca permite que seja possível de forma natural a cultura e desenvolvimento de linhagens celulares cardíacas. Esta abordagem é uma técnica relativamente recente e tem originado uma grande quantidade de estudos que

permitem suportar a capacidade dos hidrogéis em reproduzir funções biológicas específicas da matriz extracelular cardíaca.

Apesar da grande utilização de biomateriais sintéticos neste tipo de formulação, a preparação de hidrogéis compostos exclusivamente com polietilenoglicol (PEG) não tem apresentado ainda resultados significativos. Porém, esta barreira tem sido colmatada através da utilização de vários copolímeros de PEG que têm permitido que seja possível a obtenção de vários benefícios. (Johnson e Christman, 2013) Exemplo disso será a utilização de uma estrutura composta pelos copolímeros metoxi-PEG, caprolactona sintética e ácido dodecanodioico (DDDA) em conjunto com células estaminais da medula óssea (BMSC) ressuspendidas em α -ciclodextrina numa injeção intramiocárdica após um enfarte agudo do miocárdio (EAM). Foi observada quatro semanas após a injeção uma melhoria geral da função cardíaca acompanhada de um aumento da retenção celular e densidade vascular na zona de enfarte, prevenindo assim a expansão de tecido cicatrizado. (Wang *et al.*, 2009)

A combinação de PEG com biomateriais naturais tem permitido também a obtenção de efeitos desejáveis na reparação cardíaca considerando a sua propensão natural para proporcionar as interações apropriadas entre a matriz e as células transplantadas. (Pascual-Gil *et al.*, 2015) Através da preparação de um hidrogel de matriz composta por fibrinogénio bovino peguado seguida de integração de cardiomiócitos ventriculares neonatais e injeção miocárdica em ratos que sofreram EAM, foi possível constatar que, além de se obter maior retenção do hidrogel no tecido, foram obtidas melhorias gerais na função cardíaca 30 dias após a administração bem como um aumento da espessura da parede anterior cardíaca. (Habib *et al.*, 2011)

4.2.1.2 - TERAPIAS MOLECULARES

Devido à natureza líquida dos hidrogéis, fator que facilita a sua administração cardíaca, a utilização dos mesmo para a libertação de proteínas tem sido, cada vez mais, alvo de grande interesse e estudo por parte da comunidade científica. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

Neste caso, a utilização de hidrogéis termo-sensitivos tem assumido grande importância para uma remodelação positiva e melhoria da função cardíaca quando estes são combinados com fatores de crescimento. (Pascual-Gil *et al.*, 2015) Considerado isto, a construção de um hidrogel termo-sensitivo constituído por PEG, N-hidroxissuccinimida e por poli(δ -valerolactona) conjugado com fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV) e a sua injeção miocárdica em ratos que sofreram EAM permitiu obter resultados que suportam a sua utilização. Foi relatado que 35 dias após a injeção foram obtidas maiores melhorias

relativamente à fração de encurtamento, fração de ejeção, elastância sistólica final e volume sistólico final no grupo sujeito ao FCEV em relação ao grupo controlo. Foi também possível obter uma maior prevenção da expansão de cicatriz e dilatação ventricular. (Wu *et al.*, 2011)

4.2.2 - NANOFIBRAS

As nanofibras consistem em matrizes poliméricas tridimensionais estruturadas por fibras que são produzidas com um diâmetro inferior a 500 nm e apresentam propriedades mecânicas e flexibilidade melhoradas em comparação com outras formas do mesmo material. Devido às suas propriedades únicas tem sido desenvolvida uma investigação extensiva para a sua utilização em propriedades regenerativas podendo, até ao momento, ser utilizadas como sistemas de libertação de fármacos, estruturas de suporte e até mesmo ambos. (Pascual-Gil *et al.*, 2015; Pelipenko, Kocbek e Kristl, 2015)

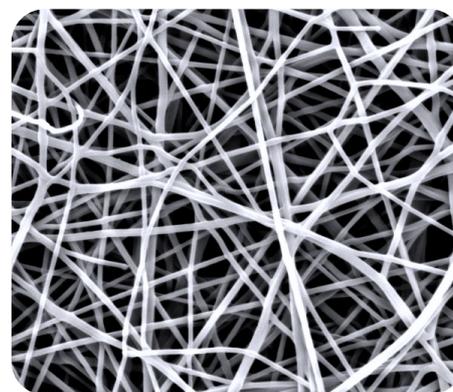


Figura 3 – Nanofibras.

Estruturas sob a forma de nanofibras detêm propriedades únicas considerando a sua dimensão reduzida e estas podem ser produzidas utilizando uma grande variedade de biomateriais. No entanto, aquando da sua utilização devem ser consideradas as propriedades intrínsecas de cada polímero para que sejam obtidas as propriedades mecânicas, taxas de degradação e interações celulares de interesse para a sua aplicação específica. (Pelipenko, Kocbek e Kristl, 2015)

Exemplo de biomateriais utilizados na construção de nanofibras são: o quitosano, o colagénio, o ácido hialurónico e a celulose, no que diz a biomateriais naturais; o álcool polivinílico (PVA), o polietilenoglicol (PEG) e a polivinilpirrolidona (PVP), relativamente aos biomateriais sintéticos. (Pascual-Gil *et al.*, 2015; Pelipenko, Kocbek e Kristl, 2015)

4.2.2.1 - TERAPIAS CELULARES

A utilização de estruturas sólidas de nanofibras permite que se consiga um bom aprisionamento das células inseridas o que, por sua vez, permite uma maior taxa de desenvolvimento e sobrevivência. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

Um tipo de estrutura que tem sido estudada envolve a utilização de nanofibras de carbono que possibilitam reforçar estruturas de polímeros, obter excelentes propriedades mecânicas e também conferir alguma condutividade elétrica. Aproveitando estas características, foi investigada a utilização de estruturas compostas por nanotubos de carbono condutivo e quitosano e cardiomiócitos de rato, que possuíam propriedades elásticas similares ao miocárdio. A utilização destas estruturas permitiu verificar que não só eram capazes de suportar as células transplantadas como também foram capazes de estimular a expressão de miosina de cadeia pesada, troponina T e conexina-43, importantes para a contração muscular, condução elétrica e organização celular dos impulsos elétricos cardíacos. (Martins *et al.*, 2014)

Através da mistura de poli(ϵ -caprolactona) com gelatina para produzir nanofibras por eletrospinning e integração de células estaminais mesenquimais permitiu obter uma estrutura híbrida que foi transplantada em ratos que sofreram EAM. As células integradas foram capazes de promover a formação de vasos sanguíneos no local de enfarte por mobilização dentro da estrutura. Isto permitiu que, ao fim de 4 semanas, fosse possível observar uma restrição da expansão da parede ventricular esquerda, redução do tamanho de tecido cicatrizado e uma melhoria na função cardíaca em comparação com o grupo de controle. (Kai *et al.*, 2014)

4.2.2.1 - TERAPIAS MOLECULARES

Apesar de existirem já alguns estudos, a utilização de nanofibras como sistemas de libertação de proteínas é ainda um campo por explorar no que diz à sua aplicação na reparação de tecido cardiovascular. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

De entre os estudos efetuados, está um no qual foi produzida uma nanofibra composta por PLGA e no qual foi inserido fator de crescimento fibroblástico (FCF). A aplicação deste sistema permitiu, após 6 semanas, obter uma melhoria na formação neo-vascular, fluxo sanguíneo, fração de encurtamento e no número de células proliferativas. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

Em outro estudo realizado, o PVA foi combinado com dextrano para formular nanofibras sólidas para injeção e libertação de fator de crescimento fibroblástico numa população ovina que sofreu EAM. Após a sua aplicação no epicárdio foi observada através de uma libertação contínua do fator de crescimento uma angiogénese significativamente aumentada, um aumento da espessura das paredes do miocárdio. Apesar de todas estas vantagens não foi obtida uma melhoria da função cardíaca. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

4.3 - BIOMATERIAIS COMO TRANSPORTADORES

4.3.1 - NANO E MICROPARTÍCULAS

Nanopartículas e micropartículas são estruturas sólidas de tamanho reduzido, na ordem do nanómetro e micrómetro, nas quais um princípio ativo ou outra molécula está dissolvido, retido, encapsulado ou adsorvido. Este tipo de estruturas tem demonstrado uma grande aplicação no tratamento de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, pela sua grande capacidade de atuar como um sistema de libertação de fármacos, sendo até caracterizado como um dos sistemas mais versáteis da atualidade. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)



Figura 4 – Nanopartícula.

Podendo ser preparadas a partir de uma imensa variedade de biomateriais e dependendo da utilização de cada um podem assim ser modulado o seu perfil de libertação, a sua taxa de degradação e a sua localização específica. Na generalidade, estes sistemas sofrem uma maior e mais rápida biodegradação *in situ* que os hidrogéis e as nanofibras, fator que acrescenta maior interesse visto que a sua total eliminação dos tecidos biológicos permite assim evitar reações inflamatórias indesejadas. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

4.3.1.1 - TERAPIAS CELULARES

A utilização de nanopartículas em conjunto com células estaminais pode recorrer à ligações covalentes entre as mesmas, adsorção entre estas e internalização das nanopartículas no interior das células. Esta abordagem permite assim aumentar o tempo de circulação das células, direcionar as mesmas para tecidos específicos e melhorar a função celular *in vivo*, modular as suas interações e entregar moléculas específicas e genes. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

No que diz a micropartículas, estas já podem ser formuladas para encapsular ou reter células na sua superfície. (Pascual-Gil *et al.*, 2015) Num estudo realizado, foram encapsuladas células estaminais do fluido amniótico humano em micropartículas porosas de PLGA e observadas as modificações provocadas no tecido cardiovascular. Foi possível concluir que através da utilização deste sistema foi possível obter uma densidade capilar aumentada e uma

remodelação positiva do tecido, bem como uma função cardíaca melhorada em comparação com o grupo de controlo. Foi também possível observar que as células estaminais utilizadas sofreram uma boa taxa de retenção e se diferenciaram em linhagens cardiomiogénicas e angiogénicas. (Huang *et al.*, 2012)

4.3.1.2 - TERAPIAS MOLECULARES

Comparativamente à utilização de células juntamente com este tipo de sistemas, a encapsulação de moléculas ou proteínas tem sido investigada com maior extensão principalmente devido à capacidade que as nano e micropartículas tem de as proteger contra a degradação e libertar de maneira controlada. A possibilidade de modificar a sua superfície, a capacidade de passar através da microcirculação (por administração intravenosa) e a sua fraca vulnerabilidade à eliminação por mecanismos imunes acrescentam a estes sistemas propriedades que permitem explorar a sua utilização controlada no direccionamento para o tecido cardiovascular. Exceptuam-se na administração endovenosa as micropartículas devido ao seu maior tamanho, fator que pode causar efeitos indesejados. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

A utilização de fator de crescimento de estrutura similar à insulina (IGF-I) ligado a nanopartículas de PLGA para injeção nas proximidades da área afetada pelo enfarte levou primariamente a uma maior retenção do IGF-I no local que permitiu uma redução da apoptose de cardiomiócitos e promoção do melhor funcionamento do ventrículo esquerdo. (Cui, Yang e Li, 2016)

Através da encapsulação de VEGF em micropartículas compostas de PLGA e a sua injeção intramiocárdica em ratos que sofreram EAM permitiu observar um aumento significativo na angiogénese no miocárdio e nas suas proximidades em comparação com o grupo de controlo. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

4.3.2 - LIPOSSOMAS

Os lipossomas consistem em vesículas de forma esférica compostas de uma ou várias bicamadas fosfolípídicas. Apesar da sua grande utilização numa grande variedade de patologias, não existe ainda nenhuma formulação aprovada para uso humano no tratamento de doenças cardiovasculares. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

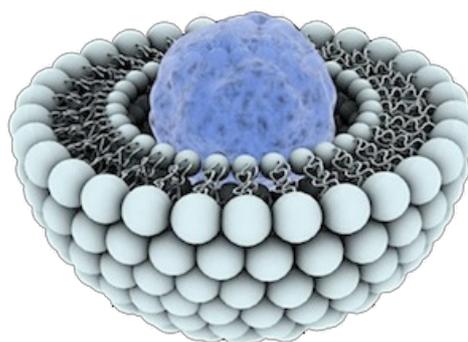


Figura 5 – Lipossoma.

A utilização de lipossomas como sistemas de libertação de agentes terapêuticos tem sido abordada com grande eficácia quando é necessário contornar algumas dificuldades que surgem na utilização clínica de alguns fármacos. (Dasa *et al.*, 2015)

A estrutura característica dos lipossomas permite que sejam incluídos na sua superfície uma grande variedade de ligandos tal como anticorpos, fragmentos de anticorpos e péptidos específicos para o tratamento da patologia em questão. Esta inclusão superficial permite que ocorra uma acumulação do agente terapêutico no tecido desejado, reduzindo também a exposição de tecido saudável ao mesmo e aumentando assim o seu tempo de meia-vida. (Dasa *et al.*, 2015)

Apesar da possibilidade da sua utilização na reparação de tecidos e considerando que um tecido cardiovascular pós-enfarte possui uma variedade de células que podem ser abordadas como potenciais alvos dos lipossomas, é ainda necessária uma maior compreensão acerca dos ligandos que permitem interagir com estas células e modular as suas atividades no processo de regeneração cardíaca. (Dasa *et al.*, 2015)

4.3.2.1 - TERAPIAS CELULARES

Considerando a sua dimensão e as suas propriedades, existe uma maior variedade de estudos efetuados através da utilização de compostos proteicos em comparação com a utilização concomitante de células, pelo que será exclusivamente abordada a utilização de proteínas na sua estrutura. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

4.3.2.2 - TERAPIAS MOLECULARES

Considerando as propriedades físico-químicas dos lipossomas e a sua capacidade de direcionar a terapêutica para os tecidos desejados, muitas estratégias têm surgido para que seja possível tirar proveito das suas vantagens. Um exemplo dessas estratégias é a peguilação que consiste na ligação de polímeros de PEG às proteínas de interesse na terapêutica. Esta abordagem permite assim aumentar o tempo de permanência e reduzir a opsonização realizada pelo sistema imunitário. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

Esta abordagem pode ser verificada num estudo que foi realizado e no qual foram utilizados lipossomas peguilados compostos por fosfatidilcolina e colesterol. Durante a sua preparação foram incubados com anticorpos IgG2a de rato, específicos para ligação à selectina P, uma molécula presente no endotélio aquando da resposta a situações de

isquemia e inflamação. Após este processo, o VEGF foi encapsulado por estes sistemas e administrados através de uma veia na cauda de ratos que sofreram EAM. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

Após a administração foi possível observar uma acumulação seletiva dos imunolipossomas (IL) na região de enfarte miocárdico e consequente libertação concentrada de VEGF no local de interesse, o que permitiu obter uma melhoria na fração de encurtamento e função sistólica, derivados de um aumento na quantidade de vasos sanguíneos presentes no local. (Pascual-Gil *et al.*, 2015)

5. PERSPETIVAS FUTURAS DE DESENVOLVIMENTO

O potencial que os biomateriais representam no campo da regeneração cardíaca é inegável considerando todos os resultados que tem sido possível obter através das diferentes formulações e combinações celulares e moleculares.

Considerando que o coração constitui a maior fonte bioelétrica do corpo humano, a utilização e desenvolvimento de polímeros condutivos assume grande importância para o futuro por forma a melhorar a funcionalidade cardíaca e as comunicações entre a estrutura implantada e o miocárdio do doente. Isto torna-se crucial considerando a importância da estimulação elétrica para a organização proteica, polarização celular e propagação do sinal elétrico cardíaco. (Cui, Yang e Li, 2016)

Aliado à utilização de biomateriais, a impressão 3D promete cada vez mais a possibilidade de produzir estruturas biomédicas complexas através do planeamento e desenho computacional, permitindo assim que se possam desenvolver estruturas cada vez mais adaptadas às necessidades específicas de cada doente, bem como a criação de estruturas inovadoras e que não seriam possíveis através de qualquer outra técnica. (Chia e Wu, 2015)

Principalmente após o recente aumento do interesse público em apostar neste ramo da tecnologia, existem já vários tipos de impressoras que são economicamente acessíveis e que permitem aos investigadores a criação de estruturas complexas que serão importantes para o estudo na regeneração dos vários tecidos e órgãos e acelerar assim o processo de investigação. (Chia e Wu, 2015)

Isto porque, no que diz à engenharia de tecidos, as estruturas que são criadas para implantação são importantes para as diferentes interações fisiológicas tal como a infiltração e proliferação celular, remodelação da matriz extracelular e fornecimento de estímulos bioquímicos que influenciem o comportamento celular. Nestas estruturas, a arquitetura de nível macro (ex. forma), micro (ex. porosidade) e nano (ex. adesão superficial) são relevantes e o desafio na sua modulação pode ser ultrapassado através da engenharia computacional e impressão 3D. (Chia e Wu, 2015)

6. CONCLUSÃO

No que diz respeito à reparação e regeneração do tecido cardiovascular, é possível observar que a engenharia de tecidos e a utilização dos mais variados biomateriais constitui um potente plataforma para o desenvolvimento da medicina regenerativa no campo das doenças cardiovasculares.

A utilização conjunta de biomateriais, células e proteínas tem demonstrado ser uma abordagem promissora na formação de novo tecido cardíaco funcional que torne possível a restituição da estrutura e funcionalidade cardiovascular. O grande desafio será otimizar para cada doente a combinação perfeita destes três componentes, bem como a maximização da compatibilidade entre as estruturas implantadas e o tecido do hospedeiro por forma a obter o melhor resultado possível no que diz à recuperação da função cardíaca.

Apesar de todos os avanços já efetuados no campo dos biomateriais, considerando a grande quantidade de biomoléculas que estão envolvidas na regeneração cardíaca, é ainda um grande desafio a capacidade de promover a completa ativação de todos os mecanismos essenciais para que seja possível obter uma reparação e regeneração cardíaca em toda a sua extensão.

Ainda assim, com um aprofundamento do conhecimento de todos os efeitos que as várias características físicas e químicas que os biomateriais podem oferecer vai permitir uma maior compreensão das suas interações e efeitos na resposta celular, possibilitando assim uma evolução contínua e cada vez mais rápida no campo da biotecnologia, engenharia de tecidos e na medicina regenerativa.

7. BIBLIOGRAFIA

CHEN, Fa Ming; LIU, Xiaohua - Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**. . ISSN 00796700. 53:2016) 86–168.

CHIA, Helena N.; WU, Benjamin M. - Recent advances in 3D printing of tissue engineering scaffolds. **Journal of Biological Engineering**. . ISSN 10643745. 9:4 (2015) 2–14.

CICHA, Iwona *et al.* - Nano-biomaterials for cardiovascular applications: Clinical perspective. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 229:2016) 23–36.

CUI, Zhi; YANG, Baofeng; LI, Ren-Ke - Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. **Engineering**. . ISSN 20958099. 2:1 (2016) 141–148.

DASA, Siva Sai Krishna *et al.* - Development of target-specific liposomes for delivering small molecule drugs after reperfused myocardial infarction. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 18734995. 220:2015) 556–567.

HABIB, Manhal *et al.* - A combined cell therapy and in-situ tissue-engineering approach for myocardial repair. **Biomaterials**. . ISSN 01429612. 32:30 (2011) 7514–7523.

HUANG, Chieh Cheng *et al.* - Injectable PLGA porous beads cellularized by hAFSCs for cellular cardiomyoplasty. **Biomaterials**. . ISSN 01429612. 33:16 (2012) 4069–4077.

JOHNSON, Todd D.; CHRISTMAN, Karen L. - Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. **Expert Opinion on Drug Delivery**. ISSN 1742-5247. 10:1 (2013) 59–72.

KAI, Dan *et al.* - Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model. **Acta Biomaterialia**. . ISSN 18787568. 10:6 (2014) 2727–2738.

KEANE, Timothy J.; BADYLAK, Stephen F. - Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**. . ISSN 15329453. 23:3 (2014) 112–118.

MARTINS, Ana M. *et al.* - Electrically Conductive Chitosan/Carbon Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. **Biom.** 15:2 (2014) 635–643.

PASCUAL-GIL, S. *et al.* - Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials. **Journal of Controlled Release.** . ISSN 18734995. 203:2015) 23–38.

PELIPENKO, J.; KOCBEK, P.; KRISTL, J. - Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. **International Journal of Pharmaceutics.** . ISSN 18733476. 484:1–2 (2015) 57–74.

WANG, Tao *et al.* - Novel thermosensitive hydrogel injection inhibits post-infarct ventricle remodelling. **European Journal of Heart Failure.** . ISSN 13889842. 11:1 (2009) 14–19.

WU, Jun *et al.* - Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. **Biomaterials.** . ISSN 01429612. 32:2 (2011) 579–586.

ZAVAGLIA, C. A. C.; PRADO DA SILVA, M. H. - Feature Article: Biomaterials. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering.** 10:2016) 1–5.

Referências das Figuras

Figura 1 - Coração Humano (http://robozzle.com/igoro/211px-CoeurHumain_svg.gif), acessado em 13/09/16.

Figura 2 - Hidrogel (<http://www.nanowerk.com/spotlight/id35162.jpg>), acessado em 13/09/16.

Figura 3 - Nanofibras (http://www.elmarco.com/upload/obrazky/galerie_obrazku/nanofibers-pa6-5000x-magnified-29.jpg), acessado a 13/09/16.

Figura 4 - Nanopartícula (<http://www.thesleuthjournal.com/wp-content/uploads/2013/05/nanoparticles.jpg>), acessado a 13/09/16.

Figura 5 - Lipossoma (<http://worldschoiceproducts.com/images//liposomal/liposome.png>), acessado a 13/09/16.