

Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual

Advances and applications of tissue bioengineering

Conceição Silva Oliveira¹, Marion Nascimento¹, Erasmo de Almeida Junior², Mady Crusóe², Poliana Bahia³, Fabiana Paim Rosa⁴

¹Mestrandos do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ²Doutorandos do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ³Graduanda do curso de Farmácia - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; ⁴Professora do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil

Resumo

A bioengenharia compila conhecimentos de grandes áreas da ciência, como a biologia e a engenharia, que são aplicados atualmente na medicina reparadora. Recentes avanços na área da engenharia tecidual possibilitaram o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos biomateriais. Estes devem estimular a adesão, diferenciação e proliferação celular, e ainda promover a produção de moléculas específicas do tecido-alvo. As células usadas na terapia podem ser mesenquimais de medula óssea, células adultas específicas do próprio paciente e também as células-tronco embrionárias, as quais têm capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens *in vitro*. As células-tronco têm sido empregadas em diversas áreas da saúde. Células mesenquimais e polpa dental são fontes de células-tronco que podem se diferenciar em fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos. Para que ocorra tal diferenciação, são necessários alguns sinais para direcionar as etapas do desenvolvimento e da regeneração tecidual. Um dos grandes desafios da engenharia tecidual é desvendar esses sinais e etapas para tentar entender as sinalizações necessárias à reprodução do tecido. Os avanços das pesquisas com células-tronco e a bioengenharia tecidual abrem oportunidades para desenvolver novas terapias, como a terapia gênica e os estudos relacionados com a angiogênese. Hoje em dia, sabe-se que as células-tronco adultas estão presentes nos vasos sanguíneos, no pâncreas, no fígado, no cérebro, na polpa dentária, entre outros tecidos, mas são as células da medula óssea as mais estudadas no contexto de muitas doenças, especialmente as cardiovasculares. Depois das células-tronco embrionárias, o tratamento biológico mais questionado é a terapia gênica. Para corrigir defeitos genéticos, é preciso inserir genes na célula que, na maioria das vezes, são introduzidos por meio de vírus. Este artigo tem como escopo abordar a atuação das células-tronco, a angiogênese, a terapia gênica na bioengenharia tecidual e a interação celular associada aos biomateriais.

Palavras-chave: Bioengenharia Tecidual – Biomateriais – Células-Tronco – Angiogênese – Terapia Gênica – Interação Celular.

Abstract

Bioengineering compiles knowledge of major areas of science such as biology and engineering, which are currently used in restorative medicine. Recent advances in tissue engineering have enabled the development and improvement of new biomaterials. These should encourage adherence, differentiation and proliferation, and yet promote the production of specific molecules of the target tissue. The cells used in therapy can be the bone marrow's mesenchymal cells, specific adult cells from the patient, as well as the embryonic stem cells which have the capacity to differentiate themselves into multiple lineages in vitro. Stem cells have been used in several areas of health. Mesenchymal cells and dental pulp are sources of stem cells that can differentiate themselves into fibroblasts, cementoblasts and osteoblasts. In order to obtain such differentiation some signs are necessary to direct the development's and the tissue's regeneration's steps. One of the major challenges of tissue engineering is to discover these signs and steps with the purpose of understanding the necessary signals for the tissue's reproduction. Advances in research on stem cells and on tissue bioengineering offer opportunities to develop new therapies such as gene therapy, as well as studies related to angiogenesis. Nowadays, it is known that the adult stem cells are present in blood vessels, pancreas, liver, brain, dental pulp, among other tissues, however the bone marrow cells are the most studied in the context of many diseases, especially the cardiovascular ones. After the embryonic stem cells, the most questionable biological treatment is the gene therapy. In order to correct genetic defects, it is necessary to insert genes into the cells which, most of the times, are introduced by means of virus. This article has the scope of approaching the role of the stem cells, the angiogenesis, the gene therapy in tissue bioengineering and the cell's interaction associated with biomaterials.

Keywords: Tissue Bioengineering – Biomaterials- Stem-Cells – Angiogenesis – Gene Therapy – Cell Interaction.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia conheceu, nas últimas décadas do

século XX, uma expansão intensa, tanto na aquisição de novos conhecimentos, quanto no desenvolvimento de processos tecnológicos e de sua aplicação na área de produção de insumos para a área de saúde e de prestação de serviços. Ela segue atualmente múltiplas vertentes, frequentemente complementares e interativas (BOROJEVIC, 2009).

Recebido em 22 de janeiro de 2010; revisado em 18 de maio de 2010.

Correspondência / Correspondence: Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela. 40.110-100 Salvador Bahia Brasil.

A biotecnologia celular aplicada à medicina e saúde envolve a área de genômica, com sua extensão para a terapia gênica, que é uma nova técnica que emerge como um resultado direto da revolução de DNA recombinante (ABDULLAH et al., 2008); envolvendo diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção de doenças e de modulação de defeitos metabólicos. Uma área emergente da biotecnologia médica é a engenharia de tecidos e órgãos, associada com a biologia estrutural e a biomimética. Essa área é profundamente ancorada em conhecimentos da biologia dos sistemas supramoleculares, da biologia celular e tecidual, da biologia do desenvolvimento e da forma, e dos sistemas integradores dos organismos superiores (CARVALHO, 2009; BOROJEVIC, 2009).

A engenharia tecidual constitui uma área recente de pesquisa multidisciplinar e a definição mais ampla desta área incluiria entre seus objetivos o desenvolvimento e manipulação de implantes artificiais, de tecidos gerados em laboratório e/ou de células ou moléculas capazes de substituir ou estimular funcionalmente partes defeituosas ou lesadas de nossos organismos (CARVALHO, 2009).

Tecidos altamente expostos ao estresse externo são intensamente regenerados, como o epitélio intestinal ou cutâneo, bem como tecidos caracterizados por alta taxa de renovação, como as células sanguíneas. Além disso, tecidos lesados por trauma, doença ou senescência podem ser eventualmente regenerados, quando necessário (CARVALHO, 2009).

A grande importância dessa área é devida às modificações demográficas e sociais. O aumento progressivo da idade média das populações humanas, e em particular das populações urbanas, gera a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade da vida, compatível com um custo e uma carga social aceitáveis. Por outro lado, as populações jovens, vivendo em aglomerações de alta densidade, estão mais expostas a lesões traumáticas. Ambas as situações exigem terapias que possam preservar, melhorar e/ou restaurar as funções teciduais (BOROJEVIC, 2009).

Neste sentido, a bioengenharia pode representar uma ação de restauração local (como um implante dentário com otimização da osteo-integração) ou a indução de diferenciação de células-tronco para produção de células tecido-específicas (CARVALHO, 2009). A célula-tronco é um tipo especial de célula que possui a capacidade de se diferenciar em células de vários tecidos e regenerá-los (CARVALHO, 2001; SANTOS; SOARES; CARVALHO, 2004). Assim, ao se multiplicarem mantêm a quantidade de células indiferenciadas constantes (LACERDA; MARTINS, 2007).

A integração de terapia gênica, engenharia tecidual e biomateriais apresentam o potencial para criar ambientes sintéticos que forneçam os sinais necessários para promover a formação dos tecidos funcionais (JANG et al., 2006). A biocompatibilidade dos materiais está

diretamente associada ao comportamento das células em contato com o material e particularmente pela adesão na superfície (ANSELME, 2000; VAN KOOTEN; SPIJKER; BUSSCHER, 2004; LUCCHESI et al., 2008).

A finalidade deste trabalho é contextualizar a importância da Bioengenharia Tecidual e suas aplicabilidades e, conseqüentemente, na qualidade de vida de pacientes. Para isso expomos as tendências de alguns estudos que empregam esse recurso tecnológico.

CÉLULAS-TRONCO E SUAS APLICABILIDADES EM BIOENGENHARIA TECIDUAL

Definição e classificação de células-tronco

As células-tronco (CT) funcionam como um mecanismo de manutenção, diferenciando-se fisiologicamente em vários tipos de células do organismo, uma vez adultas, são conhecidas como células-tronco somáticas (CARVALHO, 2001). É uma célula indiferenciada capaz de proliferar e de originar outras células-tronco (o que é denominado auto-regeneração) e células com capacidade de se diferenciar, originando células diferenciadas com capacidade funcional normal (CARVALHO, 2001; SANTOS; SOARES; CARVALHO, 2004). Assim, ao se multiplicarem mantêm a quantidade de células indiferenciadas constantes (LACERDA; MARTINS, 2007).

As CTs podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, oligopotentes e unipotentes (LACERDA; MARTINS, 2007).

- As CTs totipotentes estão presentes apenas no estágio anterior à blástula, por volta do quarto dia de formação do embrião. Estas são capazes de se diferenciarem em todos os 216 tipos de tecidos do corpo humano, incluindo placenta e anexos embrionários;
- As CTs pluripotentes ou multipotentes diferenciam-se nos tecidos humanos, com exceção da placenta e anexos embrionários. Surgem quando atingem a fase de blastocisto, quinto dia de desenvolvimento, e proliferam-se rapidamente;
- As CTs oligopotentes são as que conseguem se diferenciar em poucos tecidos e podem ser encontradas no intestino;
- As CTs unipotentes são as que conseguem se diferenciar em um único tipo de tecido, normalmente no tecido de origem.

As CTs oligopotentes e unipotentes são consideradas CTs somáticas, assim como as do cordão umbilical de um feto recém-nascido. Costumam ser denominadas de acordo com a sua origem como as CTs hematopoiéticas, queratinócitas, adipócitas, mesenquimais. Essas não podem ser utilizadas em qualquer tratamento por não apresentarem a mesma plasticidade das células-tronco embrionárias. As CTs somáticas são encontradas em vários tecidos de crianças e adultos. Elas ocorrem em número reduzido, pelo fato dos tecidos já estarem bem especializados, e

para isolá-las é necessária a utilização de técnicas mais precisas (LACERDA; MARTINS, 2007).

As CTs embrionárias são pluripotentes, sendo capazes de gerar qualquer célula do organismo e são encontradas apenas em embriões. Caso as condições do meio mudem, elas podem se diferenciar e não possuem mais a capacidade de gerar um embrião (CARVALHO, 2001). Só podem ser utilizadas em tratamentos após sua diferenciação total, ou seja, não restando uma célula sequer indiferenciada no meio produzido para garantir uma correta regeneração do tecido sem causar tumores (LACERDA; MARTINS, 2007).

As CTs hematopoiéticas pluripotentes são encontradas na placenta e no cordão umbilical, podendo ser colhidas por punção. Pela técnica de criopreservação em nitrogênio líquido, estas poderão ser utilizadas no futuro como terapia celular (BOROJEVIC; BALDUINO, 2004; PARK; EVE, 2009). De acordo com Gowdak (2006), estas também podem ser encontradas na medula óssea vermelha, possuindo a capacidade de se diferenciar em granulócitos, mielóides e linfóides, com função de recuperação hematológica por meio de transplante e em várias outras células especializadas (GOWDAK, 2006). Nesta última década, populações de células-tronco adultas têm sido encontradas em muitos tecidos adultos além da medula óssea e do trato gastrointestinal, incluindo o cérebro, pele e músculo (ATALA, 2009).

As CTs mesenquimais dão origem a fibroblastos, osteócitos, condrócitos e adipócitos possuindo potencial oncogênicos (LACERDA; MARTINS, 2007). São conhecidas também como CT do estroma (OKAMOTO; MOREIRA-FILHO, 2004) com a capacidade de se diferenciar em células de linhagem dos tecidos conjuntivos, além dos já citados. Podem ser encontradas em adultos e em embriões (WU *et al.*, 2006). Quando o deslocamento ocorre de modo indevido, essas células podem originar tumores com vários tipos de tecidos em seu interior como dente, cabelo, pedaços de osso (MOORE; PERSAUD, 2000).

Todas as CTs possuem uma problemática inerente, a saber, uma eventual desregulação em seu ciclo celular, que pode originar células cancerígenas. Isso provavelmente ocorre devido ao acúmulo de mutações em alguns genes e, algumas vezes, estímulos do microambiente acontecem e promovem a reprodução desordenada dessas células (LACERDA; MARTINS, 2007). A bioengenharia tecidual e a medicina regenerativa compõem novas áreas que investigam técnicas de regeneração tecidual a partir de marcadores naturais (fatores de crescimento) e componentes do próprio organismo (células-tronco mesenquimais) (ROSE; OREFFO, 2002).

Há aproximadamente quatro décadas, descobriu-se a potencialidade das células-tronco hematopoiéticas diferenciarem-se em múltiplos tipos distintos (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005). Apesar da existência de questões éticas envolvidas, o poder científico na manipulação

dessas células torna-se ilimitado, na medida em que as suas características fenotípicas sejam adequadamente mapeadas. Assim, a bioengenharia tecidual é uma área sem fim aparente, onde os maiores entraves residem na aplicação clínica dos seus achados *in vitro* (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005).

Dessa forma, as células-tronco mesenquimais proporcionam, ao menos teoricamente, essa inesgotável fonte celular que, a depender do tipo e do fator de crescimento envolvido, pode originar determinado tecido ou vários tecidos do corpo, tais como ósseo, cartilaginoso, adiposo, fibroso, muscular e medular. Os fatores de crescimento, por sua vez, desempenham papel fundamental no controle da proliferação e diferenciação desses tipos específicos de células (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005).

Terapia celular

A pesquisa básica de biologia celular e da medicina está ativamente em curso para selecionar células candidatas adequadas para terapia celular (TABATA, 2009). As terapias celulares e a bioengenharia atuam no contexto da medicina regenerativa, procurando controlar e ampliar a capacidade natural da regeneração de tecidos. A regeneração mantém naturalmente a homeostasia tecidual, substituindo continuamente as células inutilizadas (BOROJEVIC, 2008).

Os elementos celulares são o ingrediente fundamental para as terapias celulares e a bioengenharia. O conceito de células-tronco ou células progenitoras foi claramente definido no contexto de regeneração tecidual. Organismos primitivos que possuem uma alta capacidade de regeneração serviram de modelos ricos para a compreensão dos processos morfogenéticos regenerativos (BEKKUM, 2004). A presença de células pluripotentes, com ampla capacidade de reconstituição de novos tecidos foi visivelmente definida nesses modelos. No fim do século XX, o conceito amplo de células-tronco em animais superiores foi confirmado, e a sua aplicação em medicina regenerativa abriu novos caminhos de terapias celulares (BIANCO; ROBEY, 2001; PRENTICE, 2006).

Tecido sanguíneo

Uma das doenças que mais causa mortalidade no mundo é o infarto no miocárdio. O corpo tenta reparar o tecido que morreu, mas não o substitui com atividade fisiológica cardíaca, pois os miócitos não se dividem. As CTs hematopoiéticas recebem comando genético por proteínas específicas, transformam-se em cardiomiócitos e recuperam o miocárdio e o bombeamento sanguíneo. Vários pacientes obtiveram sucesso com essa técnica, não necessitando mais de um transplante de coração (LACERDA; MARTINS, 2007).

Algumas pesquisas envolvendo tecidos já obtiveram êxito em se diferenciar a partir de CTs hematopoiéticas (tecido sanguíneo). Os hemocitoblastos, que originam

essas células, reconstituem o tecido lesado, principalmente o miocárdio. Tecidos como a medula óssea e o tecido adiposo são ótimas fontes de CTs somáticas (LACERDA; MARTINS, 2007).

Regeneração óssea

Caplan e colaboradores (1992 *apud* REICHERT et al., 2009) foram os primeiros a investigar o potencial das CTs mesenquimais na área de engenharia de tecido ósseo através da combinação de CTs mesenquimais humanas com um arcabouço. Um número seguido de grupos utilizando exclusivamente polímeros sintéticos ou arcabouço de cerâmica (REICHERT et al., 2009).

Em contraste com outros tecidos, o osso é remodelado de forma contínua, durante toda a vida da maioria dos vertebrados, inclusive o homem. Quando lesões ou defeitos ósseos ocorrem, nas mais variadas situações clínicas, a reconstrução tecidual que devolve integridades funcionais e mecânicas constitui-se num passo necessário para a reabilitação do indivíduo. A maior parte dessas lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontânea, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005). No entanto, procedimentos de enxertia e substituição óssea são frequentemente necessários, quando da existência de defeitos extensos decorrentes de traumas, procedimentos cirúrgicos e deformidades ósseas congênitas (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005; ZHANG et al., 2010).

Uma descrição resumida do procedimento de reconstrução óssea, a partir de células-tronco mesenquimais, provenientes de um determinado volume dessas células, como sendo: o isolamento das células em cultura; a posterior expansão das mesmas *ex vivo*; o cultivo e transporte dessas células por meio de uma substância carreadora e a implantação local. Entretanto, por se tratar de reconstrução tecidual extremamente complexa, uma vez ser o tecido ósseo estrutura tridimensional com componentes internos, e apresentar taxa de renovação tecidual marcadamente inferior à pele ou sangue, pode-se presumir que esse remodelamento corresponda a uma etapa de longa duração (BIANCO; ROBEY, 2001).

Regeneração do epitélio da pele

A pele é o primeiro contato que o corpo possui com o meio exterior. É constituída de três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme ou tecido subcutâneo. A epiderme é constituída de tecido epitelial, a derme de tecido conjuntivo propriamente dito e a hipoderme de tecido adiposo. Na epiderme existe a camada córnea, que é a mais externa de todas, onde as células estão mortas, com aspecto morfológico achatado (pavimentoso). Essa camada apresenta abundância em queratina, impedindo que a água evapore ou entre no organismo e altere a osmolaridade (LACERDA; MARTINS, 2007).

Em muitas situações, a pele pode ser lesionada de diferentes formas, tais como queimaduras ou lesões perfurantes causando a perda de sua função. Muitos tratamentos se baseiam na substituição da região lesada (enxerto), com variados graus de eficiência. Atualmente, têm surgido novas possibilidades de correções deste tecido com a utilização das células-tronco (LACERDA; MARTINS, 2007).

As células epiteliais estão em constante desgaste, possuindo capacidade de renovação, em determinadas localizações. CTs epiteliais irão repor as células lesadas, podendo ser encontradas na epiderme e no epitélio gastrointestinal por estarem em locais protegidos (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

As feridas muito extensas induzem à ativação de células do estroma e do parênquima, as quais se multiplicam rapidamente para produzir fibras de colágeno e fornecer resistência. Vasos sanguíneos emitem novos brotamentos para nutrir a parte regenerada, formando um tecido de granulação. Este formará um arcabouço para sustentar células epiteliais, preenchendo a área aberta e liberando um líquido bactericida. O reparo tecidual é dependente de fatores como a nutrição, a circulação sanguínea e a idade. Grandes quantidades de proteínas são necessárias nesta situação. Desta forma, uma adequada dieta alimentar e a circulação de oxigênio estão diretamente ligados ao reparo do tecido (LACERDA; MARTINS, 2007).

Reposição dentária

A ausência dos dentes pode ocorrer a partir de defeitos genéticos, anomalias congênitas ou perdas precoces causadas por trauma, doença periodontal e cárie dentária, o que pode resultar em movimentação dos dentes remanescentes, dificuldades na mastigação e baixa auto-estima. Até o momento existem muitas possibilidades de substituição dos dentes perdidos, incluindo o uso de próteses e implantes, porém todos os procedimentos disponíveis são baseados em técnicas não biológicas. O desenvolvimento de uma técnica que permitisse aos indivíduos o crescimento de dentes de reposição em sua cavidade bucal, a partir da engenharia tecidual, evitaria as complicações das técnicas atualmente em uso e seria uma terapia altamente desejável para reposição de dentes *in situ* (HAU et al., 2006).

Após a odontogênese, CTs remanescentes podem ser encontradas na polpa dentária, sendo responsáveis pela diferenciação de novas células que substituem odontoblastos necróticos e secretam dentina reparadora em casos de lesões cariosas ou preparos cavitários profundos (HAU et al., 2006).

Alguns estudos demonstraram que existe a possibilidade de se obter germes dentários a partir de células-tronco devidamente sinalizadas, os quais se desenvolvem quando transplantados em nichos adequados. Embora genes e sinais regulatórios envolvidos na odontogênese sejam conhecidos, e apesar

dos avanços obtidos no desenvolvimento de estruturas dentárias a partir de células-tronco, ainda existem obstáculos a serem superados para se conseguir substituir um dente humano perdido através da engenharia tecidual (HAU *et al.*, 2006).

Regeneração hepática

A cirrose hepática representa uma crescente carga nos cuidados da saúde por todo o mundo. Atualmente, o único tratamento alternativo é o transplante de fígado. Enquanto o transplante de fígado representa uma sobrevivência de cinco anos relativamente boa, a escassez de doadores de órgãos custa muitas vidas, todo o ano, e resulta em imunossupressão ao longo da vida. Estratégias de tratamento alternativo são, portanto, urgentemente necessárias. É devido a esse histórico que existe um entusiasmo compreensível pelo desenvolvimento com terapia de células-tronco para regeneração do fígado (KUNG; FORBES, 2009).

Recentes avanços na produção de células-tronco derivadas de hepatócitos representam uma grande promessa para o tratamento de doenças do fígado. O próximo passo essencial será definir a segurança e eficácia que precisam ser alcançadas antes da aplicação clínica das terapias com células-tronco hepáticas (KUNG; FORBES, 2009).

Regeneração orelha interna

Com base na evidência extraída de modelos animais, esforços para regenerar a orelha interna humana afetada podem envolver tanto proliferação renovada de células do epitélio auditivo mitoticamente quiescentes ou transplante de células que possam se diferenciar em células sensoriais altamente especializadas do epitélio sensorial. Neste contexto, a manipulação de genes e a terapia com células-tronco representam abordagens relativamente novas e excitantes ao tratamento de perda auditiva sensorineural (VLASTARAKOS *et al.*, 2008).

As marcas alcançadas neste campo durante as últimas décadas do segundo milênio conduziram ao caminho de novas pesquisas que prometem a “audição” para pacientes que a perderam ou nunca a tiveram (VLASTARAKOS *et al.*, 2008).

Células-tronco embrionárias derivadas do blastocisto embrionário são providas de capacidade fundamental de diferenciação em todos os outros tipos de células do organismo (Figura 1). Isto tem sido recentemente confirmado, na prática, pela geração de células progenitoras de orelha interna de células-tronco embrionárias de ratos *in vitro* (LI *et al.*, 2003).

Isolamento das células-tronco da orelha interna tem sido intensamente perseguido, uma vez que elas parecem se diferenciar de forma mais completa em células ciliadas, comparado com outras células-tronco. No entanto, a população destas células pode ser diferenciada em modelos de animais mamíferos e invertebrados. Nas aves, células de suporte dentro do epitélio sensorial parecem ser os precursores celulares para a regeneração de células ciliadas (VLASTARAKOS *et al.*, 2008).

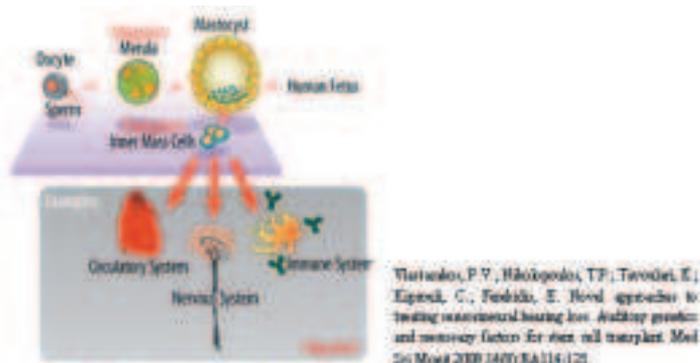
Levando-se em consideração os resultados devastadores da surdez em humanos, esforços para regenerar a orelha interna danificada e recuperar a audição contínua é um dos mais desafiadores objetivos do terceiro milênio. Isto pode ser realizado tanto pelo transplante de células-tronco, quanto pela proliferação de células renovadas do epitélio auditivo mitoticamente quiescente (VLASTARAKOS *et al.*, 2008).

ATUAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NA BIOENGENHARIA E REPARO TECIDUAL

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede de vasos pré-existent, como uma contínua expansão de um ramo vascular, em resposta ao aumento da massa tecidual (CARMELIET, 2005; DAI; RABIE, 2007). A vasculatura transporta oxigênio, nutrientes, fatores solúveis e numerosos tipos celulares para todos os tecidos do corpo (KANCZLER; OREFFO, 2008). Os vasos sanguíneos são constituídos de células epiteliais que recobrem todo o vaso, chamadas de células endoteliais, separadas do tecido subjacente pela lâmina basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Durante a formação embrionária dos vasos sanguíneos, células precursoras ou angioblastos se agregam formando as ilhotas sanguíneas. Em seguida, os angioblastos se diferenciam em células endoteliais,

Figura 1. Células pluripotentes no feto humano.



tornando-se células pavimentosas ao redor das cavidades das ilhotas (Endotélio Primitivo). Subsequentemente ocorre uma fusão das cavidades formando redes de canais endoteliais e os vasos proliferam para áreas adjacentes através de brotos endoteliais e fusionam-se com outros vasos (MOORE; PERSAUD, 2000; KANCZLER; OREFFO, 2008). O crescimento e desenvolvimento da estrutura vascular madura é um dos eventos mais precoces da organogênese (KANCZLER; OREFFO, 2008).

A angiogênese pode ser um processo fisiológico ou um processo patológico. A angiogênese fisiológica pode ser desencadeada durante a cicatrização de feridas, regeneração de órgãos, ovulação e crescimento placentário. Já a angiogênese patológica pode ser desencadeada durante o crescimento e metástase de tumores, artrite reumatóide, retinopatia diabética, inflamação, obesidade, aterosclerose, isquemia e osteoporose (CAPP et al., 2009).

Para que ocorra angiogênese, é necessário acontecimento de eventos como: aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; desarranjo da parede vascular, com remoção dos pericitos; fragmentação da membrana basal e da matriz extracelular por proteases (colagenase tipo IV e estromelina); migração da célula endotelial através da matriz extracelular remodelada; proliferação da célula endotelial e formação de brotos; formação de estruturas tubulares pelo fusão dos vacúolos citoplasmáticos; reconstituição da membrana basal; maturação dos complexos juncionais; construção da parede vascular e o estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (KANCZLER; OREFFO, 2008).

Os fatores e eventos que controlam o desenvolvimento embriogênico normal da vasculatura são também utilizados durante situações de neoangiogênese no adulto (KANCZLER; OREFFO, 2008). Fatores angiogênicos e fatores antiangiogênicos fazem parte deste sistema de controle. Dentre eles podem ser citados como fatores angiogênicos: citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento tumoral alfa (TNF- α); as quimiocinas; angiogenina; fator de crescimento de Fibroblasto (FGF); fator de angiogênese derivado do macrófago; heparina; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de transformação de crescimento beta (TGF- β). E como fatores antiangiogênicos, ou angiostáticos, podem ser citados: pericitos; endostatina; fragmentos de colágeno tipo XVIII e IV; trombospondina (KANCZLER; OREFFO, 2008).

Durante a formação de novos vasos sanguíneos, as células endoteliais recebem estímulos de fatores de crescimento endoteliais para sua proliferação celular. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína hemodímera de 34 a 42 kDa, que se constitui um agente regulador fundamental para angiogênese normal e anormal. Ele é produzido por muitos tipos

celulares, dentre eles os fibroblastos, células do músculo liso, condrócitos hipertróficos e osteoblastos. O VEGF é essencial para a diferenciação de células em alguns tecidos (DAÍ; RABIE, 2007) e, principalmente, bem caracterizado durante a formação e crescimento dos vasos (HELOTERA; ALITALO, 2007). A importância do VEGF tem sido adicionalmente comprovada pelo emprego de substâncias que neutralizam a ação do VEGF (STREET et al., 2002).

O receptor para VEGF (VEGFR) é um receptor tirosinocinase com alta afinidade para VEGF, presente principalmente nas células endoteliais (CAO, 2009). Assim como existem cinco glicoproteínas estruturalmente semelhantes que participam da mesma família de fatores de crescimento VEGF, também existem três receptores com diferentes domínios de ligação transmembrana para o VEGF, o VEGFR-1, VEGFR-2 (NIIDA et al., 2005; CAO, 2009) e VEGFR-3 (CAO, 2009). Portanto, a sinalização para angiogênese ocorre diretamente sobre as células endoteliais, via receptor de VEGF. Porém, a ação do VEGF também depende de sinalização parácrina, a qual inclui fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e angiopoietinas (Ang), que estão relacionados à estabilização da vasculatura e proteção da sobrevivência do endotélio (HELOTERA; ALITALO, 2007).

O crescimento tumoral é um processo dependente da angiogênese (FOLKMAN, 2000). As células tumorais sintetizam VEGF para estimular a angiogênese patológica ao redor do tumor. Sem a formação de novos vasos sanguíneos as células tumorais não sobrevivem. Bem irrigadas pelos novos vasos, as células tumorais, então, podem se destacar da massa tumoral e alcançar a corrente sanguínea. Consequentemente, outros tecidos também podem ser alcançados por estas células tumorais, gerando assim a metástase (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

A angiogênese e vascularização como estratégia terapêutica são de enorme benefício para as aplicações da bioengenharia tecidual (ROUWKEMA et al., 2008), principalmente nas construções teciduais da Bioengenharia tecidual (ROUWKEMA et al., 2008). Nestes casos, o suprimento de oxigênio e nutrientes à implantação tecidual é limitado ao processo de difusão que pode chegar de 100 a 200 μ m de distância do vaso mais próximo, ocorrendo, portanto, angiogênese por uma reação à hipóxia celular da implantação. Apesar disso, o crescimento vascular espontâneo é limitado a micrômetros por dia e essa é a grande limitação das grandes construções teciduais através de recursos da Bioengenharia Tecidual (ROUWKEMA et al., 2008).

Entretanto, existem algumas estratégias para a angiogênese na Bioengenharia Tecidual. Dentre elas temos: desenho do arcabouço; inclusão de fatores angiogênicos; pré-vascularização *in vivo*; pré-vascularização *in vitro*. Cada um deles concentra recursos que podem aumentar a vascularização ao redor das reconstruções teciduais, prezando sempre pela

quantidade de vasos funcionais e o sangue que ele transporta (ROUWKEMA *et al.*, 2008).

TERAPIA GÊNICA NA BIOENGENHARIA TECIDUAL

A combinação de terapia gênica e engenharia tecidual têm envolvido a implantação de células geneticamente modificadas, que tem sido aplicada a vários tecidos como osso, cartilagem e nervo. Ossos e cartilagens estão sob investigação extensiva em pesquisa de engenharia de tecidos. Um número de materiais biodegradáveis e reabsorvíveis tem sido clinicamente e/ou experimentalmente testados (BOROJEVIC, 2008).

Terapia gênica é uma nova técnica que emerge como um resultado direto da revolução de DNA recombinante (ABDULLAH *et al.*, 2008). Embora ainda experimental, envolve a transferência de informação genética para células alvo, sintetizando assim, uma proteína de interesse para tratar doenças. Na maioria dos estudos a respeito de terapia genética, um gene “normal” é inserido no genoma para substituir um gene “anômalo” causador de doença. Uma molécula transportadora, chamada vetor, precisa ser usada para enviar o gene terapêutico para as células-alvo do paciente. Atualmente, o vetor mais comum é um vírus que geneticamente é alterado para transportar DNA humano normal.

A bioengenharia tecidual fornece meios alternativos que possibilitam o desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais para incrementar a terapia gênica, visando também às construções moleculares necessárias para a expressão de proteínas em bioprocessos industriais, ou produção de vetores. Os vetores mais usados são os virais e não virais (RAMSEIER *et al.*, 2006). Pode-se exemplificar os vírus adeno-associados, retrovírus e adenovírus como os vetores virais e complexos de polímeros de DNA e plasmídeos como os não virais. Dentre os virais, os sistemas adenoviral e retroviral são bem sucedidos na engenharia tecidual óssea. Sua vantagem corresponde à alta eficiência de transdução, porém apresentam como desvantagens o potencial para mutagênese, carcinogênese e resposta imune (PARTRIDGE; OREFFO, 2004). Diante destas desvantagens as alternativas para vetores não virais foram desenvolvidas, mas existem poucos dados referentes a estes vetores na engenharia tecidual óssea. Entretanto, eles têm sido utilizados na entrega de genes para regenerar cartilagem.

O desenvolvimento de sistemas de transferência de gene é justificado para alcançar altos níveis de expressão do potencial terapêutico. Isso evitaria a necessidade de enriquecimento seletivo e cultura em longo prazo que podem contribuir para a senescência ou comprometer o enxerto em longo prazo. Além disso, através do aumento eficiência da transferência de genes, são necessárias menos células para obter um efeito terapêutico. Isto justifica a utilização de lentivirus, vetores de transdução de células mesenquimais (VAN DAMME *et al.*, 2006). O uso de vetores na bioengenharia tecidual melhora as

perspectivas terapêuticas desta nova abordagem de terapia gênica, entrega de proteína, ou engenharia de tecidos. O uso de entrega de proteínas pode ser uma alternativa favorável, pois existe a possibilidade de recuperação no caso de uma reação adversa inesperada ou quando a expressão da proteína de interesse não for mais necessária.

A integração de terapia gênica, engenharia tecidual e biomateriais apresentam o potencial para criar ambientes sintéticos que forneçam os sinais necessários para promover a formação dos tecidos funcionais. Os biomateriais proporcionam um suporte físico para a adesão celular e um modelo para formação de tecidos. Uma variedade de materiais sintéticos ou naturais tem sido utilizada como arcabouço (*scaffolds*) para formação de um novo tecido (JANG *et al.*, 2006). A bioatividade dos arcabouços pode ser melhorada através de sua utilização como veículos para entrega eficiente do gene, o que pode induzir a expressão localizada de fatores indutivos de tecidos. No entanto, as abordagens baseadas na entrega direta de vetores virais e não virais podem fornecer alternativas que evitem a necessidade de manipulação de células *in vivo* e transplantação (JANG *et al.*, 2006). Vale salientar que existem vários métodos de entrega de genes disponíveis para administrar fatores de crescimento em defeitos periodontais que oferecem grandes aplicações para a engenharia tecidual. Avanços significativos têm sido feitos no uso dos arcabouços, os quais promovem a entrega de células, genes e proteínas para lesões periodontais crônicas.

INTERAÇÃO CÉLULA (SINALIZAÇÃO) E BIOMATERIAIS

A biocompatibilidade dos materiais está diretamente associada ao comportamento das células em contato com o material e particularmente pela adesão na superfície. As características da superfície do material, topografia, composição química e superfície energética, são parâmetros importantes em estudos da biocompatibilidade e citocompatibilidade *in vitro* e correspondem à primeira fase na interação célula/material, que irá influenciar na capacidade das células se diferenciarem em contato com o implante, promovendo a reconstituição inicial do tecido original (ANSELME, 2000; VAN KOOTEN; SPIJKER; BUSSCHER, 2004; LUCCHESI *et al.*, 2008).

Para Craighead, James e Turner (2001), a interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetivação de implantes médicos, podendo definir o seu grau de rejeição. O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula/material e um melhor entendimento dos processos a nível celular durante a adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (KUMARI *et al.*, 2002). Segundo Barbanti, Zavaglia e Duek (2005), quando se trata de regeneração de órgãos e tecidos, torna-se fundamental o estudo do comportamento e

diferenciação celular induzidos pela estrutura, composição e presença de elementos biológicos dos suportes, para otimizar os mesmos e avançar em técnicas de cultivo celular, que possam permitir a reprodução dos tecidos e órgãos em toda sua complexidade. A anexação, a adesão e o alongamento das células dependentes de ancoragem, pertencem à primeira fase de interação entre célula-suporte, sendo que a qualidade desta primeira etapa influenciará as respostas subseqüentes das células e tecidos, como na capacidade das células de se proliferarem e diferenciarem em contato com o biomaterial (ANSELME, 2000; KUMARI et al., 2002).

A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois fenômenos diferentes: fase de anexação e fase de adesão. A anexação, que ocorre rapidamente, é o movimento da célula em direção ao biomaterial recém implantado, nesta ocorrem alguns eventos como ligações físico-químicas, através de forças iônicas e forças de Van der Waals (ANSELME, 2000). A fase de adesão ocorre posteriormente e envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto, que interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e consequentemente regulando a expressão gênica (ANSELME, 2000; BAXTER et al., 2002).

Para Gumbiner (1996), os aspectos da dinâmica da adesão celular necessitam de regulação destes receptores de adesão celular, que se encontram na superfície da célula. A capacidade adesiva dos conjuntos de receptores de adesão ou dos processos citoesqueleto-dependentes como o espalhamento celular, são cruciais para uma boa adesão celular, controle do crescimento e mobilidade celular. As características hidrofílicas e hidrofóbicas dos materiais são muito importantes nestas interações entre células e substrato, ou seja, as células aderem mais fortemente a superfícies de materiais mais hidrofílicos, isto pode ser explicado em parte pela própria constituição de algumas regiões da membrana celular lipídica, que sendo altamente hidratadas tendem a desenvolver contatos com superfícies igualmente hidratadas (YANG; ZHAO; CHEN, 2002; PAN; JIANG; CHEN, 2006). A adesão celular influencia vários fenômenos naturais, como: embriogênese, manutenção estrutural dos tecidos, cicatrização, resposta imune, metástase, e interação célula/material. Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, há a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais (PERTILE, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, ainda existe muita polêmica quanto às questões éticas, políticas e sociais em relação à utilização das células-tronco para aplicações terapêuticas. Apesar disso, muitas pesquisas já foram

realizadas com muitos tipos de células-tronco existentes, como abordado. Entretanto, são necessários maiores estudos em nível molecular para entender precisamente os fatores que influenciam a diferenciação das células-tronco. Acredita-se que dentro de alguns anos, com apoio da bioengenharia que visa produzir estruturas capazes de substituírem tecidos ou órgãos que perderam a sua estrutura e/ou função, as técnicas existentes possam ser aperfeiçoadas e serem aplicadas como qualidade de recuperação tecidual em pacientes.

A integração de terapia gênica, engenharia tecidual e biomateriais apresentam o potencial para criar ambientes sintéticos que forneçam os sinais necessários para promover a formação dos tecidos funcionais. Avanços significativos têm sido feitos no uso dos arcabouços, os quais promovem a entrega de células, genes e proteínas para lesões. Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, há a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais.

Pelo caráter multidisciplinar do desafio, somente a cooperação entre as ciências biológicas básicas, ciências exatas e clínica médica poderão trazer propostas que servirão para melhorar a qualidade de vida e adequar o custo social da medicina às realidades do novo milênio.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.A. et al. Cell engineering and molecular pharming for biopharmaceuticals. *Open Med. Chem. J.*, v.14, n.2, p.49-61, 2008.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v.21, n.7, p.667-681, 2000.
- ATALA, A. Engineering organs. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.20, n.5, p.575-592, 2009.
- BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.15, n.1, p.13-21, 2005.
- BAXTER, L.C. et al. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Eur. Cell Mater.*, v.4, p.1-17, 2002.
- BEKKUM, D.W. Phylogenetic aspects of tissue regeneration: role of stem cells. A concise overview. *Blood Cells Mol. Dis.*, v.32, n.1, p.11-16, 2004.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, v.414, n.6859, p.118-121, 2001.
- BOROJEVIC, R. *Biotecnologia na área de saúde humana e animal: bioengenharia e biomimética*. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_tendencias_futuras_saude.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2009.
- BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. *Gaz. Med. Bahia*, v.78, supl.1, p.42-46, 2008.
- BOROJEVIC, R.; BALDUINO, A. Terapias Celulares e Bioengenharia Tecidual. In: MIR, L. (Org.). *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004. p.295-310.
- CAO, Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci. Signal.*, v.2, n.59, p.1-11, 2009.

- CAPP, C. et al. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **HCPA**, v.29, n.1, p.51-59, 2009.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v.438, n.7070, p.932-936, 2005.
- CARVALHO, A.C.C. **Bioengenharia tecidual: uso de células-tronco na prática médica**. Disponível em: <<http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=2162>>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- CARVALHO, A.C.C. Células-tronco é promessa para medicina do futuro. **Ciência Hoje**, v.29, n.172, 2001.
- COSTA, R.C.C.; MIGUEL, F.B.; ROSA, F.P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **R. Ci. Med. Biol.**, v.4, n.1, p.70-76, 2005.
- CRAIGHEAD, H.G.; JAMES, C.D.; TURNER, A.M.P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Curr. Opin. Solid. St. M.**, v.5, n.2-3, p.177-184, 2001.
- DAI, J.; RABIE, A.B. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. **J. Dent. Res.**, v.86, n.10, p.937-950, 2007.
- FOLKMAN, J. Incipient angiogenesis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.92, n.2, p.94-95, 2000.
- GOWDAK, L.H.W. **Terapia celular em cardiologia**, n.51, 2004. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/celulas/12.shtml>>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, n.3, p.345-357, 1996.
- HAU, G.R. et al. Levantamento preliminar sobre a possibilidade de obtenção de dentes de reposição a partir de Células-tronco. **Ci. Biol. Saúde**, v.12, n.2, p.29-38, 2006.
- HELOTERA, A.; ALITALO, K. The VEGF family, the inside story. **Cell**, v.130, n.4, p.591-592, 2007.
- JANG, J.H. et al. Surface adsorption of DNA to tissue engineering scaffolds for efficient gene delivery. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v.77, n.1, p.50-58, 2006.
- JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Décima edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KANCZLER, J.M.; OREFFO, R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **Eur. Cell Mater.**, v.15, p.100-114, 2008.
- KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KUMARI, T.V. et al. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v.15, n.2, p.37-41, 2002.
- KUNG, J.W.C.; FORBES, S.J. Stem cells and liver repair. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.20, n.5, p.568-574, 2009.
- LACERDA, V.A.M.; MARTINS, C.F. Capacidade das células-tronco em regenerar o epitélio da pele. **Univ. Ci. Saúde**, v.5, n.1/2, p.135-154, 2007.
- LI, H. et al. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, n.23, p.13495-13500, 2003.
- LUCCHESI, C. et al. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.19, n.2, p.635-643, 2008.
- MOORE, K.K.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 451 p.
- NIIDA, S. et al. VEGF receptor 1 signaling is essential for osteoclast development and bone marrow formation in colony-stimulating factor 1-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, n.39, p.14016-14021, 2005.
- OKAMOTO, O.K.; MOREIRA FILHO, C.A. Células-Tronco: genômica funcional e aplicações terapêuticas. In: MIR, L. (org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.311-327.
- PAN, H.; JIANG, H.; CHEN, W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. **Biomaterials**, v.27, n.17, p.3209-3220, 2006.
- PARK, D-H.; EVE, D.J. Regenerative medicine: Advances in new methods and technologies. **Med. Sci. Monit.**, v.15, n.11, p.RA233-251, 2009.
- PARTRIDGE, K.A.; OREFFO, R.O. Gene Delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies. **Tissue Eng.**, v.10, n.1/2, p.295-307, 2004.
- PERTILE, R.A.N. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.
- PRENTICE, D.A. Current science of regenerative medicine with stem cells. **J. Invest. Med.**, v.54, n.1, p.33-37, 2006.
- RAMSEIER et al. Gene Therapeutics for periodontal regenerative medicine. **Dent. Clin. North Am.**, v.50, n.2, p.245-263, 2006.
- REICHERT, J.C. et al. Fabrication of polycaprolactone collagen hydrogel constructs seeded with mesenchymal stem cells for bone regeneration. **Biomed. Mater.**, v.4, n.1, p.1-11, 2009.
- ROSE, F.R.; OREFFO, R.O. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.292, n.1, p.1-7, 2002.
- ROUWKEMA, J. et al. Vascularization in tissue engineering. **Trends Biotechnol.**, v.26, n.8, p.434-441, 2008.
- SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.A.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.6, p.490-495, 2004.
- STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, n.15, p.9656-9661, 2002.
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J. R. Soc. Interface**, v.6, supl.3, p.S311-S324, 2009.
- TORTORA; GRABOWSKI. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- VAN DAMME et al. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. **Stem Cells**, v.24, n.4, p.896-907, 2006.
- VAN KOOTEN, T.G.; SPIJKER, H.T.; BUSSCHER, H.J. Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. **Biomaterials**, v.25, n.10, p.1735-1747, 2004.
- VLASTARAKOS, P.V. et al. Novel approaches to treating sensorineural hearing loss. Auditory genetics and necessary factors for stem cell transplant. **Med. Sci. Monit.**, v.14, n.8, p.RA114-125, 2008.
- WU, M. et al. Differentiation potential of human embryonic mesenchymal stem cells for skin-related tissue. **Br. J. Dermatol.**, v.155, n.2, p.282-291, 2006.
- YANG, X.; ZHAO, K.; CHEN, G.Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v.23, n.5, p.1391-1397, 2002.
- ZHANG, Z-Y et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. **Biomaterials**, v.31, n.4, p.608-620, 2010.