

Patrícia Amorim de Sá

Utilização de engenharia de tecidos no tratamento de feridas
crônicas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da saúde
Porto, 2015

Patrícia Amorim de Sá

Utilização de engenharia de tecidos no tratamento de feridas
crônicas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2015

Patrícia Amorim de Sá

Utilização de engenharia de tecidos no tratamento de feridas
crônicas

Assinatura do Aluno _____

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

A pele é o maior órgão do corpo humano sendo também o órgão mais suscetível de lesões que permitem a limitação da qualidade de vida de um paciente, pelo que as feridas crônicas são cada vez mais presenciadas. Para combater esta consequência surgiu a engenharia de tecidos que permite a implantação de substitutos cutâneos semelhantes à pele humana, através do desenvolvimento de suportes que são denominados por scaffolds que podem ser de origem biológica ou sintética. Associando a estes suportes as células tronco mesenquimais e uma matriz extracelular é possível regenerar o tecido lesado ou obter um novo tecido cutâneo.

Neste trabalho de revisão bibliográfica é descrito o conceito e a técnica de base da engenharia de tecidos; as células e os biomateriais utilizados nos substitutos cutâneos; a constituição da pele e a cicatrização das feridas crônicas e por fim os produtos comercializados de substitutos biológicos cutâneos.

Palavras-chave: Medicina Regenerativa; Engenharia de Tecidos; Biomateriais; Scaffolds; Tecido Cutâneo; Feridas Crônicas; Células Tronco Mesenquimais.

Abstract

The skin is the largest organ of the human body also being the most susceptible organ lesions that allow limiting the quality of life of a patient, so the chronic wounds are increasingly being witnessed. To counteract this consequence tissue engineering has emerged that allows the deployment of skin substitutes like human skin, by developing supports that are called for scaffolds that can be of biological or synthetic origin. Associating these supports stem cell mesenchymal and an extracellular matrix can regenerate damaged tissue or get a new skin tissue.

In this literature review paper describes the concept and basic technique of tissue engineering; cells and biomaterials used in skin substitutes; the constitution of the skin and the healing of chronic wounds and finally the products marketed biological skin substitutes.

Keywords: Regenerative Medicine; Tissue Engineering; Biomaterials; Scaffolds; Skin Tissue; Chronic Wounds; Mesenchymal Stem Cells

Dedicatória

É com muito orgulho que dedico este trabalho aos meus pais e ao meu namorado, em especial à minha mãe e ao meu namorado que sempre me apoiaram em todo o meu percurso acadêmico. Sem a compreensão e o apoio destes não seria possível concretizar um dos meus sonhos, o meu mestrado em Ciências Farmacêuticas que será concluído após esta dissertação.

Também agradeço a todos os meus amigos que fiz ao longo do curso, a paciência e a compreensão que tiveram ao longo destes cinco anos, pois vivenciei uma experiência única com estes.

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar à Professora Doutora Maria Pia, por toda a disponibilidade, paciência e dedicação que foram fundamentais na organização e desenvolvimento deste trabalho. E por todo o empenho que me guiou ao longo destes meses de pesquisa.

Também quero agradecer à Professora Doutora Carla Lopes por todos os conselhos que me forneceu nas aulas sobre as referências bibliográficas, pois foram muito úteis no desenrolar desta dissertação.

Índice Geral

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Abreviaturas..... | 13 |
| I. Introdução..... | 14 |
| II. Medicina regenerativa..... | 15 |
| 2.1. Conceito e as suas áreas..... | 15 |
| III. Engenharia de tecidos..... | 16 |
| 3.1. Conceito..... | 16 |
| 3.2. Técnica base..... | 17 |
| 3.3. Células..... | 19 |
| 3.4. Biomateriais..... | 22 |
| 3.4.1. Polímeros de origem natural..... | 24 |
| 3.4.2. Polímeros de origem sintética..... | 25 |
| 3.4.3. Biomateriais sintéticos..... | 27 |
| 3.5. Scaffolds..... | 29 |
| 3.6. Biorreatores..... | 33 |
| 3.7. Aplicações..... | 34 |
| IV. Feridas crônicas..... | 35 |
| 4.1. Constituição da pele..... | 35 |
| 4.1.1. Epiderme..... | 37 |
| 4.1.2. Derme..... | 38 |
| 4.1.3. Hipoderme..... | 38 |
| 4.2. Classificação e cicatrização das feridas crônicas..... | 39 |
| 4.4. Terapias convencionais..... | 42 |
| V. Engenharia de tecidos aplicada ao tratamento de feridas crônicas..... | 44 |
| 5.1. Células tronco mesenquimais..... | 44 |
| 5.2. Potencial regenerativo das células tronco mesenquimais em feridas crônicas.... | 46 |
| 5.3. Substitutos biológicos cutâneos..... | 46 |

VII. Bibliografia 54

Índice de Figuras

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Técnica de base da engenharia de tecidos (adaptada de Barbanti e Zavaglia, 2005)..... | 18 |
| Figura 2 - Tipos de scaffolds (adaptado de Chung e Park, 2007) | 31 |
| Figura 3 - Processo da engenharia de tecidos com a utilização de um biorreator (adaptado de Partap et al., 2010) | 34 |
| Figura 4 - Constituição da pele (adaptado de Seeley et al., 2003) | 37 |
| Figura 5 - Representação esquemática da cicatrização de uma ferida crônica (adaptado de Santos et al., 2012)..... | 40 |
| Figura 6 - Ilustração das propriedades das células tronco mesenquimais (adaptado de Morais e Wenceslau, 2009) | 45 |
| Figura 7 - Imagem ilustrativa em que compara um substituto biológico dermo-epidérmico (apligraf) com a pele humana natural (adaptado de Kim et al., 2000b) | 49 |

Índice de Tabelas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Exemplos de biomateriais aplicados à engenharia de tecidos (adaptado de Barrère et al., 2008) | 28 |
| Tabela 2: Métodos utilizados para a fabricação de scaffolds na engenharia de tecidos (adaptado de Liu et al., 2007) | 32 |
| Tabela 3: Produtos comercializados pela engenharia de tecidos e aprovados pela FDA (adaptado de Barbanti e Zavaglia, 2005) | 34 |

Lista de Abreviaturas

ECM- Matriz extracelular

FDA- Administração de comida e medicamentos

HA- Ácido hialurônico

MMPs- Metaloproteinases

PEG- Poli (etileno glicol)

PLA-Poli (ácido láctico)

PLGA- Poli (ácido láctico-co-glicólico)

TIMPs- Inibidores tecidulares das metaloproteinases

I. Introdução

A utilização de transplantes evoluiu em grande escala para tratar algumas doenças que estão relacionadas com órgãos lesados ou até mesmo órgãos que deixam de funcionar por completo (Verma e Singh, 2014). A principal limitação e a mais preocupante na utilização da biologia de transplantes é a disponibilidade de órgãos para todos os pacientes que se encontram em lista de espera, mas existe outra limitação muito importante que é a rejeição crônica do órgão por parte do sistema imunológico do paciente o que leva a um desequilíbrio na relação de imunomodulação-imunossupressão (Lanza *et al.*, 2007). As causas que levam os órgãos a ficarem lesados ou a perderem a sua função por completo resumem-se no desgaste dos órgãos e dos tecidos através de um processo natural que ocorre com o avançar da idade, num acidente ou através de doenças (Verma e Singh, 2014). Segundo os mesmos autores as opções de tratamento convencionais disponíveis são os transplantes de órgãos, a reparação cirúrgica, as próteses, os dispositivos mecânicos e a terapia com fármacos. Estes autores concluíram que foi através dos transplantes que surgiu a engenharia de tecidos para o desenvolvimento de novos órgãos conforme é necessário, este conceito de engenharia de tecidos assegura o crescimento de estruturas de tecidos com células de origem natural ou sintética.

A pele é o maior órgão do nosso corpo sendo que a sua principal função é a de barreira de proteção contra agentes externos, também apresenta outras funções como a conservação da homeostasia, a termorregulação e a deteção sensorial. A perda da integridade de grandes porções de pele por causa de uma doença ou lesão pode resultar numa deficiência ou até mesmo levar à morte. As feridas agudas cicatrizam em tempo hábil pelos processos de inflamação, formação de tecido e remodelação. O atraso destes processos de reparação leva à formação de feridas crônicas que podem suceder pela perda de pele significativa. Estas feridas podem ser causadas por uma lesão térmica que é a lesão mais comum, devido a traumas, por complicações da doença *diabetes mellitus* originando úlceras crônicas e devido a doenças vasculares que originam úlceras vasculares (Lanza *et al.*, 2007).

Devido à compreensão do processo de cicatrização de feridas, à avaliação da ferida, à ação dos fatores de crescimento, à função da matriz extracelular na regulação do processo de tratamento e devido à engenharia de tecidos que permite a construção de tecidos é possível usar como terapêutica na reparação de tecidos o fornecimento do epitélio perdido. A engenharia de tecidos usa como substitutos de pele dois tipos de produtos, os que são à base de células que estimulam ativamente a cicatrização de feridas e produtos acelulares que fornecem um substrato ou um revestimento para facilitar a cura das feridas (Lanza *et al.*, 2007).

II. Medicina regenerativa

2.1. Conceito e as suas áreas

A medicina regenerativa consiste na reparação, regeneração ou substituição de células, tecidos ou órgãos para restaurar a sua função através de terapias eficazes, consistentes e seguras que são constituídas por células vivas, administradas isoladamente ou em combinação com materiais desenhados (Polak, 2010). Neste tipo de medicina são utilizadas as células humanas, nomeadamente as células tronco adultas, as células tronco embrionárias e a última versão de células estudadas consistem em células reprogramadas a partir de células adultas para que possam ser chamadas de células pluripotentes (Mason e Dunnill, 2008). Segundo os mesmos autores o sucesso da medicina regenerativa centrado em células humanas é uma tecnologia disruptiva que permite potencialmente substituir medicamentos moleculares e próteses médicas.

A engenharia de tecidos é uma das áreas mais importantes na medicina regenerativa, mas não é a única. Pois esta engenharia utiliza uma combinação de células, biomateriais e moléculas solúveis para estimular o crescimento de células e tecidos. A medicina regenerativa também utiliza os métodos da engenharia de tecidos mas esta também pode

usar outras técnicas como a engenharia de genética e a terapia de células estaminais (Daar e Greenwood, 2007).

A medicina regenerativa apresenta dois conceitos de terapia celular, a engenharia de tecidos que necessita da utilização de scaffold e uma outra vertente de terapia celular que não utiliza o scaffold (Ikada, 2006).

O surgimento da tecnologia de células tronco permitiu que a engenharia de tecidos tenha evoluído para a área mais ampla da medicina regenerativa (Nerem, 2010).

III. Engenharia de tecidos

3.1. Conceito

A definição da engenharia de tecidos consiste numa área multidisciplinar em que aplica os princípios da engenharia e da ciência da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que permitem a restauração, o melhoramento ou a manutenção das funções dos tecidos e órgãos. O termo engenharia de tecidos pode ser separado em duas palavras, tecido e engenharia. Um tecido é definido como um grupo de diferentes tipos de células que apresentam diferentes tipos de fenótipos mas em conjunto realizam uma função específica, o termo engenharia refere-se aplicação do conhecimento para construir e implantar no ser humano (Verma e Singh, 2014).

Na maior parte das vezes o objetivo desta engenharia consiste na implantação das construções de tecido no corpo para reparar uma lesão ou substituir a função de um órgão que está lesado (Berthiaume *et al.*, 2011).

Resumidamente a engenharia de tecidos baseia-se em técnicas para a reconstrução de tecidos e órgãos, em que a técnica inclui a expansão *in vitro* de células viáveis do paciente dador sobre suportes de polímeros bioreabsorvíveis. O suporte degrada-se enquanto um novo tecido ou órgão se forma (Santos e Wada, 2007).

A engenharia de tecidos utiliza quatro componentes essenciais, que são as células vivas, um suporte, a matriz extracelular (que fornece os fatores de crescimento) e por vezes biorreatores no caso de produção *ex vivo* (Verma e Singh, 2014).

Os produtos da engenharia de tecidos podem ser usados em duas situações, a primeira é para construção *in vitro* de tecido bioartificial a partir de células do dador, esta técnica é utilizada quando se pretende substituir os tecidos ou órgãos com defeito. E a segunda situação é quando se pretende modificar *in vivo* o crescimento e a função das células, o que implica a regeneração *in situ* (Verma e Singh, 2014).

Devido à engenharia de tecidos funcionar como uma alternativa potencial para o transplante de órgãos e tecidos, esta tecnologia clínica pode ser considerada como um tratamento médico (Polak, 2010).

3.2. Técnica base

A técnica da engenharia de tecidos resume-se na regeneração de tecidos vivos e de órgãos através da anexação de tecido do próprio paciente que posteriormente é decomposto em células que tem como função a síntese de matrizes de tecido novo (Polak, 2010). Estas células são cultivadas em suportes biológicos ou sintéticos, como os *scaffolds* que fornecem o ambiente adequado para as células efetuarem as suas funções (Barbanti e Zavaglia, 2005). Estes suportes devem de ser preferencialmente biodegradáveis, para que quando sejam introduzidos no paciente, o organismo consiga reabsorver, degradar e eliminar. Também é fornecido aos suportes uma matriz extracelular que fornece fatores

de crescimento que facilitam e promovem a função das células que é regenerar tecido novo, oxigênio, fatores de diferenciação entre outros. Se o crescimento do tecido for realizado *ex vivo* este carece de um biorreator, que em conjunto com a matriz fornece condições que se tem *in vivo*. E por fim é reintroduzido o tecido no paciente (Lanza *et al.*, 2007).

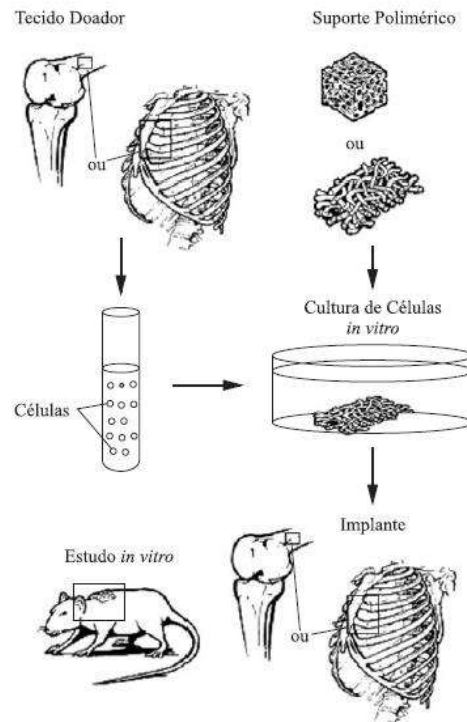


Figura 1 - Técnica de base da engenharia de tecidos (adaptada de Barbanti e Zavaglia, 2005)

A figura 1 adaptada de (Barbanti e Zavaglia, 2005) resume-se às seguintes etapas, em primeiro lugar realiza-se a seleção e o processamento do suporte de acordo com a escolha do tipo de células, posteriormente inocula-se a população celular que foi retirada ao paciente no suporte. Neste suporte vai suceder uma fase inicial em que o crescimento do tecido é prematuro, depois deste tecido estar em contacto com a matriz extracelular e esta fornecer-lhe as condições ambientais favoráveis fica maturado em sistema fisiológico e é adicionado um biorreator porque este tecido está a ser realizado *in vitro*. Depois destas etapas efetua-se o re-implante cirúrgico *in vivo* e observa-se a integração do produto.

A utilização da engenharia de tecidos *in vivo* permite que as células sejam inseridas diretamente no organismo do paciente num suporte com fatores de diferenciação, permitindo que as células se desenvolvam corretamente ou as células podem ser introduzidas já diferenciadas para que se possam desenvolver no local alvo. Quando se utiliza a técnica *in vitro* é utilizado biorreatores como já foi descrito no parágrafo anterior, o uso destes é importante para que as células formem um tecido que possa ser implantado *in vivo* (Lanza et al., 2007).

3.3. Células

As células são muito importantes para a regeneração e reparação de tecidos devido aos mecanismos que estas conseguem fazer que são a sua proliferação e diferenciação, sinalização célula a célula, produção de biomoléculas e formação da matriz extracelular (Chapekar, 2000).

Na construção de um tecido a partir da técnica de engenharia de tecidos o primeiro ponto a considerar são os tipos de células a utilizar. As células a usar podem ter três tipos de origem: podem ser autólogas, alogénicas e xenogénicas. As células autólogas são as células vulgarmente conhecidas por células do próprio paciente, estas incluem as células diferenciadas e células estaminais / progenitoras adultas. Este tipo de células tem um número de fontes muito elevado. As células alogénicas são células de outros seres humanos que não incluem o próprio paciente e as células xenogénicas são células de origem animal (Lanza *et al.*, 2007).

A utilização das células autólogas permite a aceitação imunitária das células uma vez que estas são do próprio paciente, evitando riscos de rejeições imunológicas e infeções virais. Estas células podem ser extraídas por biópsias do próprio paciente, é uma técnica que se destina à maior parte das estruturas dos órgãos como por exemplo a pele, fígado, coração, vasos sanguíneos, osso, medula óssea e cartilagem. Mas para alguns órgãos e tecidos não se podem realizar biópsias que é o caso das válvulas cardíacas e dos tecidos neurais. A

solução para superar esta complicação na obtenção da fonte celular é o isolamento de células estaminais (Ferreira *et al.*, 2012).

As células alogénicas também são extraídas através de uma biópsia mas de um dador e as células xenogénicas são retiradas do animal vivo. Este tipo de células apresenta o problema de ocorrer rejeições imunológicas, por isso sempre que possível deve se optar por células alogénicas embora seja um processo que exige mais custos económicos (Lanza *et al.*, 2007).

O principal tipo de células estaminais utilizadas na engenharia de tecidos é as células tronco porque estas apresentam duas características fundamentais a capacidade de autorrenovação ilimitada o que origina a criação de mais células tronco e a capacidade de se diferenciarem em diferentes linhagens celulares. As células tronco exibem dois grupos principais que são os das células tronco embrionárias que se encontram no interior do embrião (no estágio blastocisto) e o das células tronco não embrionárias que são obtidas principalmente através da medula óssea e do sangue do cordão umbilical (Bajada *et al.*, 2008).

As células tronco embrionárias são pluripotentes, o que significa que uma célula tronco pode-se dividir e produzir todas as células diferenciadas no organismo, enquanto as células tronco não embrionárias são apenas multipotentes, ou seja, são capazes de se diferenciar num número limitado de outros tipos de células. O uso das células tronco embrionárias tem gerado uma grande polémica devido às questões éticas o que significa que este tipo de células possui muitas dificuldades para ultrapassar até poderem ser utilizadas livremente na engenharia de tecidos. Apesar destas dificuldades está comprovado que as células tronco embrionárias são mais efetivas do que as células tronco não embrionárias porque estas últimas não apresentam pluripotência. As células tronco adultas ou células tronco não embrionárias, não apresentam tantos problemas éticos pelo que podem ser encontradas em diversos locais do organismo como por exemplo: no cordão umbilical, no tecido adiposo, na medula óssea, na pele e outros (Bajada *et al.*, 2008).

O uso das células tronco embrionárias só pode ser realizado em tratamentos após a sua diferenciação total, o que significa que não pode haver nenhuma célula indiferenciada no meio produzido para garantir uma correta regeneração do tecido sem aparecimento de tumores (Oliveira *et al.*, 2010).

As células tronco não embrionárias provenientes do cordão umbilical podem fornecer células através do sangue do cordão umbilical (que são as células hematopoiéticas) ou a partir do tecido do cordão umbilical (são designadas de células mesenquimais) (Bajada *et al.*, 2008).

As células hematopoiéticas são pluripotentes e também podem ser encontradas na placenta. Estas células podem ser empregadas na terapia celular utilizando a técnica de criopreservação em nitrogênio líquido (Oliveira *et al.*, 2010).

As células mesenquimais são multipotentes o que significa que devido à sua competência de se diferenciar em vários tipos de células do ser humano podem ser usadas para o tratamento de variadas doenças. Estas células têm a vantagem de estar disponíveis nos cordões umbilicais que são rejeitados após o parto o que proporciona uma fonte ilimitada de células estaminais com poucos problemas éticos levando a que este tipo de células sejam as ideais para bancos de células tronco (Bajada *et al.*, 2008).

Este tipo de células mesenquimais também é conhecido como células tronco do estroma podem originar fibroblastos, osteócitos, condrócitos e adipócitos com potencial oncogénico. Apresentam a desvantagem de quando o deslocamento ocorre de maneira imprópria estas células podem originar tumores com vários tipos de tecidos. Mas todas as células tronco apresentam esta desvantagem em comum, pois quando ocorre uma desregulação no seu ciclo celular podem originar células cancerígenas (Oliveira *et al.*, 2010).

As células tronco mesenquimais são uma ferramenta única de engenharia de tecidos possibilitando a regeneração de tecidos, a cicatrização de feridas agudas e crônicas e a reorganização da cicatriz (Zahorec *et al.*, 2014).

3.4. Biomateriais

Um biomaterial é definido como um material sintético que é utilizado para fazer dispositivos médicos ou implantes de forma a serem seguros, económicos e fisiologicamente admissíveis, destinam-se a interagir com sistemas biológicos. Sendo o objetivo dos biomateriais reconstituir a função dos tecidos vivos naturais e dos órgãos (Park e Lakes, 2007).

Os biomateriais devem satisfazer alguns requisitos tais como: a biocompatibilidade para que o material execute uma resposta apropriada numa determinada aplicação, sem a obtenção de reações adversas quando este entra em contacto com os tecidos vivos; a biodegradabilidade para a reconstrução de um tecido sem inflamação; os seus produtos de degradação não devem ser tóxicos nem devem provocar inflamação e devem ser retirados do corpo através das vias metabólicas; biologicamente ativos possuindo ligandos que sejam reconhecidos pelas células de interesse; ausência de toxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade; facilidade de manipulação, reprodutibilidade e processamento em larga escala (Ratner *et al.*, 2013; Williams, 2008; Kim *et al.*, 2000a).

A biocompatibilidade é um dos requisitos mais importantes no uso de biomateriais na técnica da engenharia de tecidos, quando as células entram em contacto com o material ou aderem á sua superfície o comportamento destas células vai ser influenciado pela biocompatibilidade dos materiais. Existem três características da superfície dos materiais que são importantes e relevantes nos estudos da biocompatibilidade *in vitro*, estas são: a topografia, a composição química e a superfície energética. Estes estudos correspondem à primeira fase na interação da célula com o biomaterial porque conseguem determinar a

capacidade das células se diferenciarem ou não em contacto com o implante, caso as células se diferenciem provocam a reconstituição do tecido original (Oliveira *et al.*, 2010).

As características hidrofílicas e hidrofóbicas dos materiais condicionam as interações entre as células e os materiais porque as células aderem vigorosamente à superfície de materiais mais hidrofílicos. Uma das explicações plausíveis para que isto aconteça é que algumas regiões da membrana celular lipídica são muito hidratadas e tendem a desenvolver contactos com superfícies igualmente hidratadas (Oliveira *et al.*, 2010).

Um biomaterial ideal tem de ser biocompatível como já foi mencionado nos parágrafos anteriores, deve promover a interação entre o tecido e o desenvolvimento celular, deve de possuir propriedades físicas e mecânicas adequadas e por fim deve ser biodegradável e biorreabsorvível para permitir a reconstrução de um tecido sem que ocorra um processo inflamatório (Kim *et al.*, 2000a).

Os biomateriais podem ser aplicados através hidrogéis injetáveis ou diretamente injetados no tecido, em transportadores ou scaffolds (Kim *et al.*, 2000a).

Na engenharia de tecidos os biomateriais incluem os seguintes tipos: polímeros, cerâmicos, compósitos e ocasionalmente metais. Sendo que os polímeros são os mais procurados na engenharia de tecidos devido às suas semelhanças que apresentam com as características estruturais do tecido e também oferecem uma elevada versatilidade mecânica (Chen *et al.*, 2013).

Existem duas origens de polímeros utilizados na engenharia de tecidos: os polímeros de origem natural e os polímeros sintéticos. Os polímeros de origem natural têm a vantagem de serem reconhecidos biologicamente, por outro lado os polímeros sintéticos tem a vantagem de serem produzidos de forma reprodutível em larga escala (Kim *et al.*, 2000a).

3.4.1. Polímeros de origem natural

Existem três classes que pertencem aos polímeros de origem natural, que são as proteínas (colagénio, fibrina e seda), os polissacarídeos (agarose, alginato, derivados do ácido hialurónico e o quitosano que é um dos principais derivados da quitina) e os polinucleótidos (DNA e RNA) (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

A natureza apresenta uma elevada quantidade de fontes de materiais para a formação dos scaffolds que promovem a regeneração de tecidos. A classe correspondente aos polissacarídeos que contém o alginato e o quitosano, foram estudados para a regeneração de cartilagem e pele, apresentando aplicações clínicas no tratamento de feridas profundas da pele e da cartilagem (Barrère *et al.*, 2008).

Os polímeros de origem natural tem a grande vantagem de apresentarem locais para a adesão celular o que os torna biocompatíveis que é um dos principais requisitos na eleição dos biomateriais, no entanto também têm desvantagens que exigem muita ponderação pois é necessário confirmar a pureza da proteína ou do polissacarídeo antes de se realizar o implante para que não ocorra uma resposta imunitária, assim como também apresentam dificuldades em controlar a variabilidade de lote para lote (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

As proteínas consistem em polímeros de peso molecular elevado que contém aminoácidos, sendo estas o principal componente dos tecidos moles e duros do ser humano têm sido investigadas para a formação de scaffolds na engenharia de tecidos (Scheper, 2006).

O colagénio é uma proteína fibrosa, que é o principal componente do tecido conjuntivo. Esta proteína tem sido muito utilizada nas aplicações de regeneração de tecidos (favorece a adesão à célula). Existem muitas desvantagens na obtenção desta proteína como por

exemplo: são difíceis de manusear e de fabricar, tem propriedades mecânicas pobres e é difícil de controlar a sua biodegradabilidade. Como já foi referido no parágrafo anterior, apesar de se ter que purificar antes de realizar o implante, existe sempre uma probabilidade do colagénio transmitir um agente patogénico e induzir respostas imunitárias (Cheung *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos são polímeros que possuem elevado peso molecular. As vantagens associadas a este tipo de polímeros consistem: na sua elevada disponibilidade, no seu custo-benefício, na capacidade de serem facilmente modificados devido à existência de grupos funcionais reativos, na sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e solubilidade em água que os torna bons biomateriais para as aplicações na engenharia de tecidos (Scheper, 2006).

O quitosano é um polímero que apresenta um elevado grau de biocompatibilidade *in vivo* e que pode formar um gele à temperatura corporal apresentando a capacidade de entregar e interagir com os fatores de crescimento e proteínas de adesão. A sua degradação pode ser controlada pela quantidade residual de teor de acetilo (Cheung *et al.*, 2007).

O ácido hialurónico é muitas vezes utilizado como veículo para as células para regenerarem vários tecidos. É um biomaterial desejável porque não é antigénico o que faz com que não ocorra reações inflamatórias (Cheung *et al.*, 2007).

3.4.2. Polímeros de origem sintética

Os polímeros sintéticos são uma alternativa aos polímeros naturais porque estão na base de suportes que servem para a cultura de células estaminais. Estes materiais apresentam muitas vantagens como por exemplo: a reprodutibilidade porque exibem uma composição química bem definida, uma taxa de degradação específica e podem ser moldados de forma independente. Mas também existem algumas desvantagens a considerar, a mais

importante é que muitos polímeros sintéticos não possuem locais de adesão da célula e para que isto possa ser ultrapassado o biomaterial pode ser quimicamente modificado para permitir a aderência de culturas de células estaminais (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

Os biomateriais de origem sintética apresentam vantagens sobre o uso de biomateriais de origem natural, porque são biomateriais produzidos pelo homem o que faz com que estes sejam mais flexíveis, previsíveis e processáveis em diferentes tamanhos e formas (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

Atualmente existem poucos produtos da engenharia de tecidos sobretudo produtos sintéticos disponíveis para uso clínico que possam ser utilizados como substituintes de tecidos moles e funcionais como por exemplo o músculo e o tecido conjuntivo. As razões para que haja poucos produtos no mercado não são totalmente conhecidas, mas provavelmente deve-se às incompatibilidades mecânicas entre o biomaterial e o tecido (Chen *et al.*, 2013).

O poli (ácido láctico-co-glicólico) e o poli (etileno glicol) são os polímeros sintéticos mais utilizados para fazer suportes que são empregados para a cultura de células estaminais (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

O PLGA (poli ácido láctico-co-glicólico) consiste em monómeros de ácido glicólico e ácido láctico, o que significa que na presença de células os suportes de PLGA degradam-se em monómeros que são metabolitos naturais. Este polímero também apresenta a vantagem de ser biodegradável, possuindo a capacidade de modular a velocidade de degradação. Mediante estas razões os scaffolds de PGLA são muito utilizados na engenharia de tecidos. Existem vários estudos de scaffolds de PGLA com células mesenquimais para a formação de tecido adiposo. Outro estudo que também foi realizado e bastante interessante é a combinação de scaffolds de PGLA com células estaminais adultas provenientes do tecido adiposo para criar tecido muscular (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

O PEG (poli etileno glicol) é bastante utilizado nos biomateriais devido à sua capacidade de resistir à absorção de proteínas. Os scaffolds de PEG foram avaliados quanto à sua adaptabilidade como substituto para o osso, a cartilagem, o nervo, o fígado e o tecido vascular (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

3.4.3. Biomateriais sintéticos

Os biomateriais sintéticos são: os polímeros de origem sintética que já foram abordados nos parágrafos anteriores, os cerâmicos, os metálicos e os compósitos (Chen *et al.*, 2013).

Os biomateriais à base da cerâmica são materiais inorgânicos que são usados como meio de substituição de osso lesionado. A hidroxiapatite é um material cerâmico e também é um dos principais minerais do osso o que faz com que este tipo de biomateriais sintéticos tenham sido investigados e sintetizados como um substituto para o tecido ósseo (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

Existem algumas desvantagens associadas aos biomateriais de cerâmica, como por exemplo: têm baixa resistência ao impacto, são difíceis de processar e de fabricar (Bhat e Kumar, 2012).

Os biomateriais metálicos são utilizados como implantes dentais e como malha para a reconstrução facial. Estes apresentam algumas desvantagens como: baixa biocompatibilidade, suscetibilidade à corrosão sob ambiente fisiológico e grandes variações nas propriedades mecânicas do tecido biológico (Bhat e Kumar, 2012).

Os compósitos são constituídos por dois ou mais materiais que são utilizados em conjunto para construir um suporte que é designado de scaffold com as vantagens de cada um dos materiais que constitui o suporte (Cheung *et al.*, 2007).

Na Tabela 1 está sintetizado os biomateriais que foram referenciados ao longo deste subcapítulo.

Tabela 1: Exemplos de biomateriais aplicados à engenharia de tecidos (adaptado de Barrère et al., 2008)

| Material | Tipo | Origem | Aplicações clínicas | Propriedades |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Hidroxiapatite | Cerâmico | Sintético | Regeneração óssea | Biodegradável |
| Titânio | Metálico | Sintético | Substituição óssea e nas próteses dentárias | Não corrosivo, baixo módulo de elasticidade |
| Poliésteres (poli ácido-co-glicólico) | Polímero | Sintético | Regeneração dos tecidos moles | Biodegradável e biocompatível |
| Poli etileno glicol | Polímero | Sintético | Reparação de tecidos moles | Biodegradável |
| Colagénio | Polímero (proteína) | Natural | Reparação de tecidos duros e moles | Biodegradável |
| Ácido hialurónico | Polímero (polissacarídeo) | Natural | Reparação de tecidos moles | Biodegradável |
| Alginato | Polímero (polissacarídeo) | Natural | Reparação de tecidos moles | Degradável |
| Agarose | Polímero (polissacarídeo) | Natural | Reparação de tecidos moles | Degradável |
| Quitosano | Polímero (polissacarídeo) | Natural | Reparação de tecidos moles | Estruturalmente semelhantes aos glucosamino-glicanos |
| Fibrina | Polímero (proteína) | Natural | Cicatrização do tecido mole | Capacidade de vedação |

3.5. Scaffolds

O suporte pode ser designado por scaffold ou matriz extracelular artificial que auxilia as células na proliferação, na diferenciação e na biossíntese destas. Quando o scaffold é aplicado no local de regeneração impede que as células invasoras perturbam o local de ação e proporcionam um novo espaço tridimensional com o intuito das células se formarem em novos tecidos com estrutura e função apropriada (Ikada, 2006; Ferreira *et al.*, 2012).

Resumindo os scaffolds têm a função de fornecer uma estrutura para que as células consigam proliferar, diferenciar e anexar como já foi mencionado no parágrafo anterior, o que permite formar uma matriz extracelular. E é esta matriz extracelular que proporciona uma integridade estrutural ao tecido. É fundamental que o scaffold consiga reproduzir a estrutura e as propriedades do tecido humano para dirigir o processo de formação macroscópico do tecido (Liu *et al.*, 2007).

O scaffold pré-fabricado pode atuar de duas formas: a primeira é agir como um material de suporte protético originando a regeneração de tecido *in vivo* e a segunda é atuar como um substrato adesivo para que ocorra a formação de células *in vitro* (Chung e Park, 2007).

Um scaffold ideal deve apresentar as seguintes características: uma extensa rede de interconexão de poros para que as células possam migrar, multiplicar e anexar dentro destes; devem possuir canais através dos quais o oxigênio e os nutrientes são fornecidos para as células profundas que se encontram dentro dos scaffolds; as suas composições químicas devem de fazer com que os seus produtos de superfície e de degradação sejam biocompatíveis para que as reações imunes ou inflamatórias sejam mínimas e por fim devem ser biodegradáveis com um perfil mecânico adequado (Liu *et al.*, 2007).

Existem inúmeras proteínas que desempenham uma função fundamental na proliferação e diferenciação de células, estas proteínas são designadas de fatores de crescimento. A adição de fatores de crescimento apropriados para a construção célula-scaffold deve promover a regeneração de tecido quando comparado com a não utilização de fatores de crescimento. Um dos problemas da utilização de fatores de crescimento na engenharia de tecidos é como fornece-los para o local de ação. A injeção *bolus* de uma solução de fatores de crescimento não é eficaz devido às moléculas das proteínas que depois de injetadas são capazes de dispersar longe do local injetado. Existem três métodos que estão em estudo para adição de fatores de crescimento, o primeiro consiste na utilização de plasmídeos de ADN que contêm o gene que codifica o fator de crescimento pretendido, o segundo método explora o fator de crescimento codificado pelo gene que é transferido para células específicas que posteriormente são transplantadas para o corpo e o terceiro método baseia-se na aplicação do fator de crescimento simultaneamente com um transportador. O terceiro método é o que tem sido mais estudado para adição de fatores de crescimento na engenharia de tecidos. A utilização dos fatores de crescimento na engenharia de tecidos vai ser cada vez mais utilizada quando estes se tornarem menos caros e mais disponíveis (Ikada, 2006).

Os scaffolds podem ser produzidos por biomateriais de origem natural e sintética como já foi abordado no capítulo dos biomateriais. A maior parte dos scaffolds é produzida por materiais poliméricos, porque estes proporcionam propriedades únicas, como por exemplo: são biodegradáveis, apresentam ótimas propriedades mecânicas e são biocompatíveis (Liu *et al.*, 2007; Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Até ao presente foram desenvolvidas muitas técnicas de processamento para a fabricação de suportes poliméricos de origem natural e sintética. Ambas as origens apresentam as suas vantagens, nomeadamente os de origem natural são mais multifacetados no fornecimento de várias funções biológicas enquanto que os de origem sintética proporcionam a sua fácil processabilidade porque podem ser fabricados através de uma grande variabilidade de polímeros biodegradáveis, com degradação controlada e suscetibilidade à modificação (Chung e Park, 2007).

Existem vários tipos de matrizes, nas quais se destacam os scaffolds porosos, os scaffolds constituídos por microesferas, os hidrogéis e os scaffolds fibrosos. Os scaffolds porosos são utilizados essencialmente para promover o crescimento ósseo e o tecido do hospedeiro ou a vascularização do órgão. Os scaffolds de microesferas são bastante utilizados para a encapsulação de fármacos que sejam posteriormente libertados a uma taxa relativamente lenta ao longo de um período de tempo prolongado. Os scaffolds de hidrogéis tem sido cada vez mais estudados de forma a terem um papel fundamental na engenharia de tecidos, esse papel é caracterizado por conduzir e proporcionar um ambiente adequado para o crescimento de novos tecidos. São os hidrogéis que atualmente são empregados na cicatrização de feridas, na cartilagem, no revestimento das feridas, na regeneração óssea e como transportadores para a libertação de fármacos no organismo humano. Os scaffolds fibrosos são utilizados como suportes para a engenharia de tecidos músculo-esquelética, cartilagem, pele, engenharia de tecidos neurais e como veículo para a libertação controlada de fármacos, proteínas e ADN (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

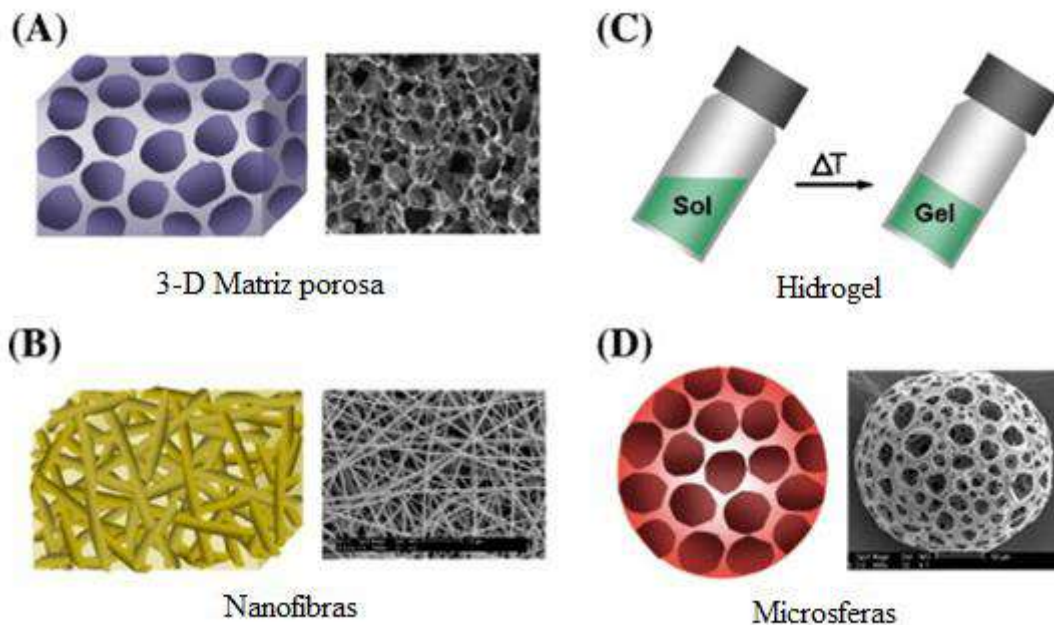


Figura 2 - Tipos de scaffolds (adaptado de Chung e Park, 2007)

Na figura 2 na imagem A) está representado uma matriz porosa, a B) corresponde às nanofibras que são utilizadas nos scaffolds fibrosos, a C) ilustra a transição sol-gel que ocorre na formação dos hidrogeles e por fim a D) corresponde aos scaffolds de microsferas (Chung e Park, 2007).

As técnicas de fabricação dos scaffolds são classificadas em quatro métodos: a evaporação de solventes simultaneamente com a lixiviação de partículas, as redes de fibra, a separação de fases em combinação com o congelamento de secagem/ secagem do ponto crítico e por fim a fabricação livre da forma sólida. Na tabela 2 estão caracterizados os quatro métodos de fabricação dos scaffolds (Liu *et al.*, 2007).

Tabela 2: Métodos utilizados para a fabricação de scaffolds na engenharia de tecidos (adaptado de Liu *et al.*, 2007)

| Técnicas de fabricação | Exigências de materiais | Biomateriais | Problemas |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Evaporação do solvente concomitantemente com a lixiviação das partículas | -Solúvel em células; -Solvente não tóxico | PLA, PLGA e Colagénio | -Toxicidade do solvente |
| Separação de fases/ emulsão em combinação com a secagem de congelamento/ secagem do ponto crítico | -Solúvel em células; -Solvente não tóxico | PLGA, PLA e Colagénio | -Tamanho do poro -Dificuldade em controlar a toxicidade do solvente |
| Redes de fibra | -Fibra | PLA, PLGA | -Ausência de rigidez |
| Forma livre de sólidos | -Baixo ponto de fusão -Termoplástico | PEG, PLA, PGLA, Colagénio e HA | -Dispendioso |

3.6. Biorreatores

Na engenharia de tecidos *ex vivo* as principais dificuldades na criação de tecidos funcionais estão associadas à compreensão limitada do papel regulador dos parâmetros físico químicos específicos da cultura no desenvolvimento de tecidos e dos elevados custos de produção nos escassos produtos da engenharia de tecidos que se encontram comercialmente disponíveis (Barbanti e Zavaglia, 2005).

Os sistemas de biorreatores possibilitam mudanças reprodutíveis e controladas de fatores ambientais específicos o que permite proporcionar meios tecnológicos para demonstrar os mecanismos indispensáveis da utilidade das células num ambiente tridimensional e também permitem melhorar o potencial da qualidade dos tecidos artificiais. Outra mudança muito importante que os biorreatores realizam é que ao automatizar e padronizar a fabricação de tecidos em sistemas fechados controlados estes permitem reduzir os custos de produção, facultando uma maior utilização da engenharia de tecidos (Barbanti e Zavaglia, 2005).

Assim pode-se definir um biorreator como um dispositivo em que os processos biológicos e bioquímicos desenvolvem-se em condições cuidadosamente controladas e monitorizadas a nível ambiental e operacional como por exemplo: o pH, temperatura, pressão, fornecimento de nutrientes e a remoção de resíduos (Barbanti e Zavaglia, 2005).

Os biorreatores podem ser utilizados de duas formas na engenharia de tecidos: auxiliando no desenvolvimento *in vitro* de tecido novo através do fornecimento de sinais reguladores bioquímico e físicos para as células e estimulando-as a passar por diferenciação ou para elaborar uma matriz extracelular antes da implantação *in vivo* (Partap *et al.*, 2010).

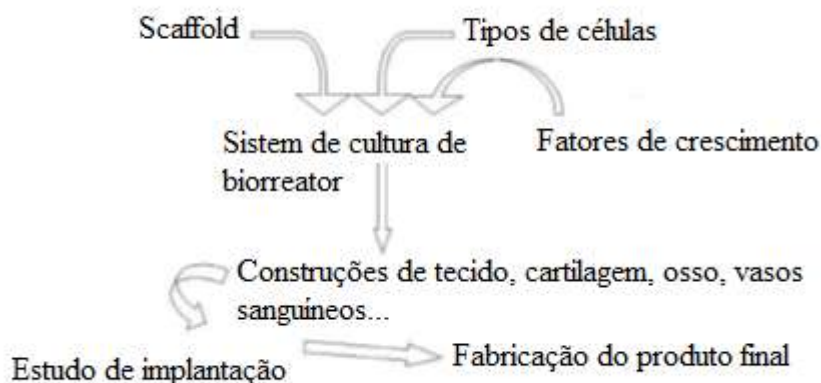


Figura 3 - Processo da engenharia de tecidos com a utilização de um biorreator (adaptado de Partap et al., 2010)

3.7. Aplicações

O primeiro produto comercializado pela engenharia de tecidos e aprovado pela FDA foi para a reconstituição da pele. Na tabela 3 estão mencionados alguns exemplos de produtos comercializados e aprovados pela FDA. (Barbanti e Zavaglia, 2005)

Tabela 3: Produtos comercializados pela engenharia de tecidos e aprovados pela FDA (adaptado de Barbanti e Zavaglia, 2005)

| Produto | Empresa | Data de lançamento | Descrição |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Apligraf® | Organogenesis Inc. | 1998 | Equivalente a pele humana |
| Carticel® | Genzyme Co. | 1999 | Cultura autóloga de condrócitos |
| Dermograft® | Smith&Nephew Co. | 2001 | Equivalente a pele humana |
| OrCel® | Ortec International Inc. | 2001 | Equivalente a pele humana |

O primeiro produto referenciado da tabela 3 (Apligraf®) é instituído para úlceras de pacientes diabéticos. Este produto é constituído pela derme e epiderme sendo que a primeira camada da pele (epiderme) é produzida pela inoculação de queratinócitos, sobre a matriz extracelular que é gerada pelos fibroblastos dérmicos. A derme é manufaturada através de uma cultura de fibroblastos que tem como base o colagénio bovino (Barbanti e Zavaglia, 2005).

O OrCel® é um dos produtos mais equivalente ao Apligraf®, a única forma de os distinguir é pela cultura de células, uma vez que o OrCel® utiliza células autólogas. O Carticel® é indicado para defeitos cartilagosos sintomáticos dos cêndilos femorais. E por fim o Dermograft® é utilizado como um substituto dérmico e utiliza o suporte de PGLA para o cultivo de fibroblastos humanos (Barbanti e Zavaglia, 2005).

Outro produto que é muito conhecido é o Integra®, é constituído por uma membrana bilateral aplicável para a substituição da pele em queimaduras e no pé diabético (Lanza *et al.*, 2007).

IV. Feridas crônicas

4.1. Constituição da pele

A pele pode ser caracterizada como o maior órgão do corpo humano, apresentando as seguintes particularidades: resistência; flexibilidade, relativamente impermeável; capacidade de se auto reparar e proteger o corpo informando-o sobre as variações do meio ambiente (Esteves *et al.*, 1992).

Este órgão tem inúmeras funções, dentro das quais se destacam as seguintes: a informação sensorial e imunológica que esta é capaz de transmitir devido a sua elevada inervação e vascularização (a pele inclui recetores sensoriais que detetam o calor, o frio, o tato, a pressão e a dor); a proteção contra agentes patogénicos e as trocas do meio ambiente (esta proteção é realizada contra a radiação ultravioleta, microrganismos e previne a desidratação ao reduzir a perda de água corporal); a conservação da homeostasia corporal que é garantida através de três processos que são a elaboração de metabolitos, a regulação hemodinâmica e a termorregulação (a regulação da temperatura corporal é efetuada pela pele através da atividade das glândulas sudoríparas e do controlo do fluxo de sangue); produção da vitamina D que executa uma função de elevada relevância a nível ósseo (estimula o consumo do ião cálcio e do ião fosfato a nível intestinal o que promove a sua libertação nos ossos, reduzindo a perda de cálcio pelos rins e aumentando os níveis séricos de cálcio e fosfato) e por último a pele consegue eliminar pequenas quantidades de produtos de excreção (Esteves *et al.*, 1992; Seeley *et al.*, 2003).

A pele subdivide-se em duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é um tecido epitelial de revestimento, pois esta suporta vários anexos cutâneos como por exemplo os pêlos, as unhas, as glândulas sudoríparas (responsáveis pela produção de suor) e as sebáceas (que produzem o sebo, formando uma película gorda sobre a pele). Esta camada assenta sobre a derme. A principal função da epiderme consiste na produção de células que protegem a pele contra o meio exterior. A derme é considerada um tecido de suporte (tecido conjuntivo) porque contém células, fibroblastos e fibras e apresenta-se unida à hipoderme. A hipoderme é responsável pela maior parte da resistência estrutural da pele e flexibilidade (Philippe, 1994).

A epiderme e a derme que constitui a pele, apoiam-se na hipoderme que a une aos ossos e aos músculos fornecendo-lhe vasos sanguíneos e nervos. A hipoderme também faz parte dos tecidos conjuntivos, tendo como função o armazenamento das reservas de lípidos e de corpos gordos que servem para o organismo se alimentar em caso de necessidades energéticas acrescidas ou devido a uma alimentação insuficiente (Philippe, 1994; Seeley *et al.*, 2003).

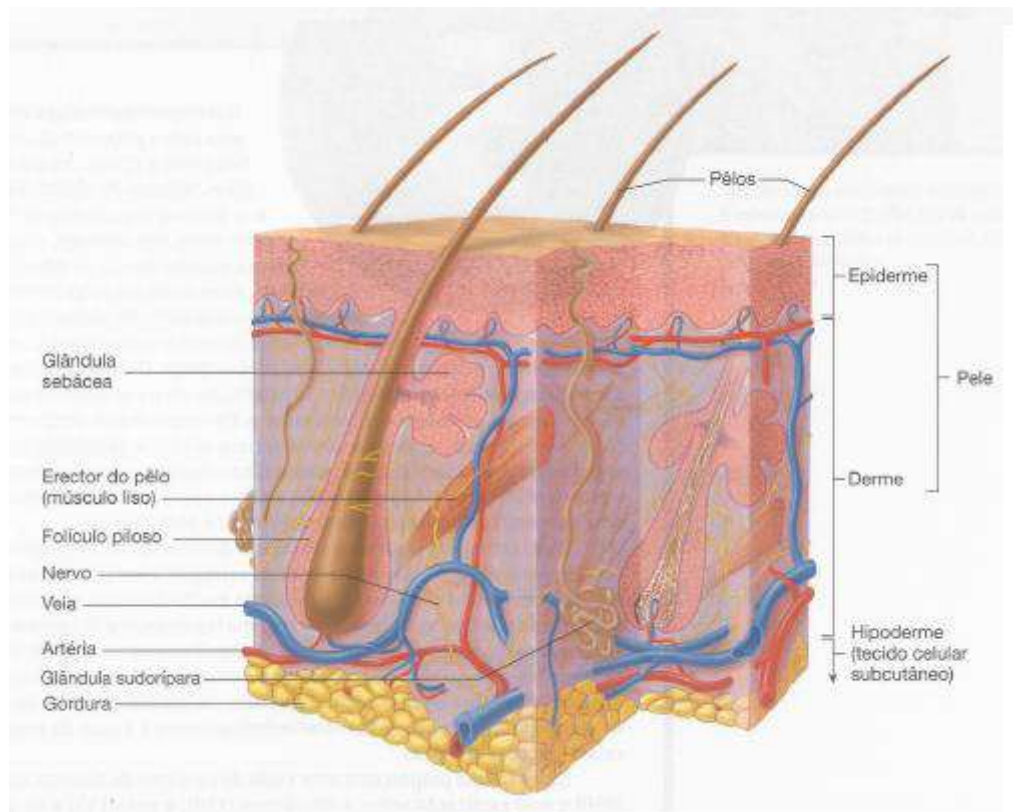


Figura 4 - Constituição da pele (adaptado de Seeley et al., 2003)

4.1.1. Epiderme

Esta camada da pele é menos espessa que a derme, porque não apresenta vasos sanguíneos. Grande parte das células da epiderme são os queratinócitos que são responsáveis pela resistência estrutural e pela permeabilidade desta. Mas existem outras células nesta camada tais como: as células Langerhans e as células de Merkel (Seeley *et al.*, 2003).

As células são produzidas na camada mais profunda da epiderme e à medida que formam novas células, estas impulsionam as células mais velhas para a superfície onde descamam. Salientando-se assim cinco camadas de células da epiderme que são: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada translúcida e camada córnea (Seeley *et al.*, 2003).

4.1.2. Derme

A principal função desta é fornecer a resistência estrutural da pele, sendo por isso constituída por tecido conjuntivo com fibroblastos, células adiposas e macrófagos. Em comparação com a hipoderme, a derme apresenta poucas células adiposas e são escassos os vasos sanguíneos. Para além das células em cima referidas, a derme também contém terminações nervosas, folículos pilosos, músculos lisos, glândulas e vasos linfáticos (Seeley *et al.*, 2003).

A derme subdivide-se em duas camadas: a camada reticular que é a mais profunda e a camada superficial que é a camada papilar. A camada reticular é a que se encontra contínua com a hipoderme (Seeley *et al.*, 2003).

4.1.3. Hipoderme

A pele sobrepõe-se na hipoderme que a une aos ossos e aos músculos subjacentes fornecendo-lhe vasos sanguíneos e nervos. Os principais tipos de células na hipoderme são: os fibroblastos, as células adiposas e os macrófagos. Cerca de metade da gordura existente no corpo humano encontra-se na hipoderme, o que lhe permite ter funções de reserva, de proteção térmica e amortecedora (Seeley *et al.*, 2003).

4.1.4. Anexos cutâneos

Os anexos da pele são: o pêlo, as glândulas sebáceas e sudoríparas e as unhas. O pêlo é dividido em duas partes a haste e a raiz. Sendo que a haste é a parte do pêlo que se encontra fora da pele tornando-se assim visível, enquanto que a raiz encontra-se por baixo da pele formando o bulbo piloso que não é visível. A estrutura que compreende o pêlo é denominada de folículo piloso. O pêlo tem uma função importante, porque se a epiderme

e a parte superficial da derme forem lesadas a parte intacta do folículo que fica sobre a derme pode constituir uma fonte de novo epitélio (Seeley *et al.*, 2003).

As glândulas sebáceas estão localizadas na derme, sendo que a maior parte destas glândulas encontram-se unidas à parte superior dos folículos pilosos a partir do qual o sebo (uma substância rica em lípidos) engordura o pêlo e a superfície da pele, evitando assim a desidratação e protege contra algumas bactérias (Seeley *et al.*, 2003).

As glândulas sudoríparas podem ser de dois tipos: as écrinas e as apócrinas. As écrinas estão localizadas em toda a superfície corporal destacando-se mais nas plantas das mãos e dos pés. As glândulas écrinas são subdivididas em duas partes: a porção profunda glomerular que se encontra localizada na derme e produz um líquido isotônico constituído por água, sais minerais, ureia, amoníaco, ácido úrico e ácido láctico e uma porção que se estende até à superfície da pele designada por canal excretor. As apócrinas encontram-se situadas nas axilas e na região perianal, sendo ativadas apenas na puberdade. Estas últimas glândulas produzem secreções inodoras que são metabolizadas pelas bactérias saprófitas originando o odor corporal (Seeley *et al.*, 2003).

As unhas são constituídas pela raiz e pelo corpo da unha, apresentando como função a proteção das extremidades dos dedos, auxiliam na manipulação e na preensão dos objetos pequenos (Seeley *et al.*, 2003).

4.2. Classificação e cicatrização das feridas crônicas

Quando ocorre uma lesão na pele são ativados mecanismos que possibilitam a regeneração e reparação da pele. Definindo-se a cicatrização de uma ferida como um processo fisiológico através do qual o organismo consegue restaurar e restabelecer as funções dos tecidos lesados. Assim conclui-se que todos os tecidos do organismo humano são capazes de se autocicatizar (Rocha *et al.*, 2006; Seeley *et al.*, 2003).

A cicatrização das feridas realiza-se através de quatro fases: vascular, inflamatória, proliferativa e de maturação ou remodelação. A fase vascular é dependente da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, é a primeira fase que ocorre após o surgimento da ferida. A fase inflamatória é descrita pela invasão de fibroblastos que se multiplicam, proliferam e secretam as proteínas específicas do tecido de reparação. Na fase proliferativa ocorre a regeneração do tecido conjuntivo e do epitélio. E por fim na maturação ou remodelação sucede-se a deposição, agrupamento e remodelação do colagénio e regressão endotelial (Rocha *et al.*, 2006; Jacob *et al.*, 1990; Flegg *et al.*, 2009).

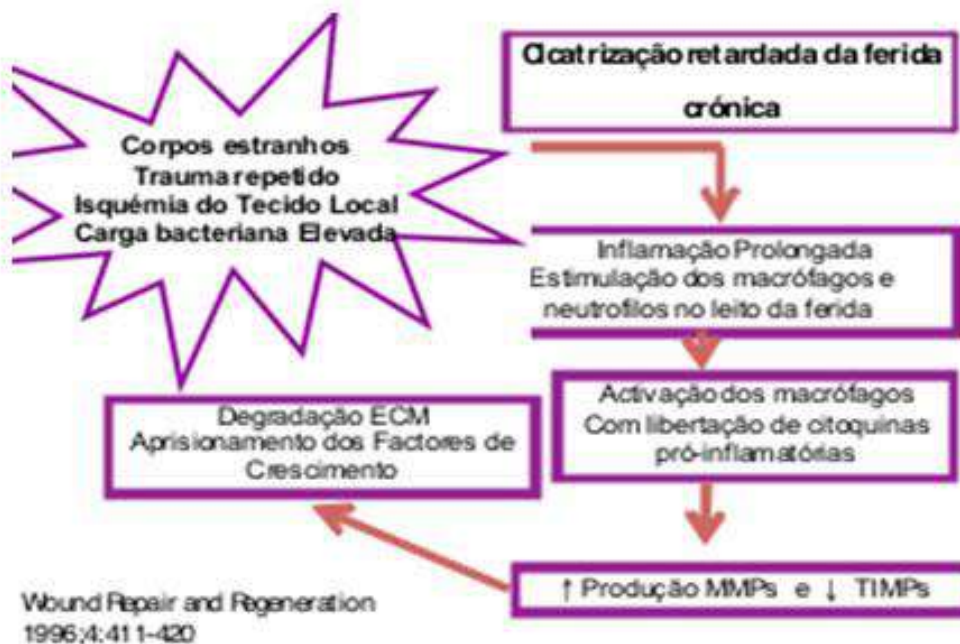


Figura 5 - Representação esquemática da cicatrização de uma ferida crônica (adaptado de Santos *et al.*, 2012)

A maior parte das feridas cicatrizam sendo denominadas por feridas agudas. As feridas crônicas podem ser definidas como uma interrupção visível na superfície corporal que não consegue cicatrizar ou necessita de um elevado período de tempo para cicatrizar. São feridas em que o seu processo de reparação falhou (Alvarez *et al.*, 2007; Werdin *et al.*, 2009).

Uma definição bastante atual de ferida crônica é a de Werdin, Tennenhaus, Schaller e Rennekampff (2009): são feridas em que o processo de cicatrização falhou por não se produzir a integridade anatômica e funcional num período de três meses (Werdin *et al.*, 2009).

As feridas crônicas distinguem-se entre si através do tamanho e da natureza, podendo algumas cicatrizar em meses e outras em anos (Alvarez *et al.*, 2007).

As feridas crônicas mais comuns são: as úlceras venosas de perna, as úlceras de pressão e as úlceras de pé diabético (Alvarez *et al.*, 2007; James *et al.*, 2008; Stadelmann *et al.*, 1998).

As úlceras de perna são causadas pela hipertensão venosa continuada, este problema pode surgir devido a alterações do sistema venoso, arterial e também pode estar associado à diabetes ou à artrite reumatoide (Abbade e Lastória, 2006).

As úlceras de pressão são causadas pela interrupção sanguínea numa determinada zona, devido a uma pressão elevada por um período de tempo prolongado (Alvarez *et al.*, 2007).

As úlceras do pé diabético derivam de complicações neuropáticas e vasculares da diabetes (Brasileiro *et al.*, 2005).

4.3. Fisiopatologia das feridas crônicas

A fisiopatologia das feridas crônicas ainda não está totalmente esclarecida, podendo abranger vários fatores: como uma menor atividade mitogénica, o envelhecimento precoce dos fibroblastos, uma maior atividade das metaloproteinases (MMPs), provocando uma maior degradação da matriz extracelular (MEC) e mecanismos inflamatórios persistentes (Laureano e Rodrigues, 2011).

4.4. Terapias convencionais

Em relação às úlceras venosas da perna as principais técnicas convencionais que têm como objetivo a cicatrização da úlcera são: a terapia compressiva, tratamento local da úlcera, medicamentos sistémicos e tratamento cirúrgico da anormalidade venosa (Abbade e Lastória, 2006).

A terapia compressiva baseia-se no uso de ataduras compressivas, meias elásticas e compressão pneumática (Abbade e Lastória, 2006).

No tratamento local das úlceras deve-se ter em atenção que inicialmente a limpeza desta deve ser realizada com soro fisiológico ou água potável e não com substâncias que apresentem propriedade antissépticas porque podem atrasar a cicatrização da ferida devido ao seu poder citotóxico. Depois da limpeza da ferida deve-se avaliar o leito da úlcera relativamente à presença de tecidos inviáveis, quantidade de exsudato e presença ou não de infeção. Na comparência de tecidos inviáveis é necessário fazer o desbridamento (remoção do tecido desvitalizado presente na ferida) porque estes tecidos favorecem infeções e impedem uma adequada reepitelização. Existem três formas de desbridamento: autolítico, químico e mecânico. O autolítico é realizado através de curativos oclusivos facultando um meio ótimo para a cicatrização, sendo assim para úlceras com excesso de exsudato utiliza-se os curativos de alginato, os curativos com

carvão e prata, os curativos com carvão e alginato e os curativos com hidropolímeros. Para as úlceras com pouco exsudato estão indicados os curativos com hidrocolóide e os hidrogéis. O desbridamento químico é efetuado pela aplicação de enzimas como a colagenase e a papaína. E por fim o desbridamento mecânico é realizado através de processos cirúrgicos ou pela aplicação de curativos que variam de húmidos a secos (Abbade e Lastória, 2006).

Os medicamentos sistêmicos que podem ser administrados são: pentoxifilina, aspirina e diosmina por terem a capacidade de estimular a cicatrização (Abbade e Lastória, 2006).

E para finalizar os tratamentos cirúrgicos são: a cirurgia das veias varicosas e a técnica da ligadura endoscópica subfascial de perfurantes insuficientes na região medial da pantorrilha (Abbade e Lastória, 2006).

Nas úlceras de pressão e úlceras do pé diabético o tratamento local é realizado pelas seguintes etapas: desbridamento, limpeza, penso e tratamento cirúrgico. O desbridamento e a limpeza já foram explicados no parágrafo anterior, uma vez que a forma de se realizar é igual á das úlceras de pressão. Os pensos são semi-oclusivos (membranas semi-permeáveis) permitindo a redução da transmissão de vapor de água gerando um micro-ambiente húmido que promove a re-epitelização e o desbridamento, reduzindo a contaminação bacteriana e a dor. As técnicas cirúrgicas incluem amputação da úlcera, bursa subjacente, calcificações de tecidos moles e osso necrótico e infetado (Rocha *et al.*, 2006; Brasileiro *et al.*, 2005).

V. Engenharia de tecidos aplicada ao tratamento de feridas crônicas

5.1. Células tronco mesenquimais

As células estaminais estão situadas nos tecidos multicelulares do organismo em todas as fases de desenvolvimento individual, como por exemplo as regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, na medula óssea, no tecido adiposo, no periósteo, no tecido muscular, e nos órgãos parenquimatosos. São células indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação a longo prazo e com uma característica que permite diferenciá-las de todos os outros tipos de células que é a plasticidade, podendo originar tecidos mesodermis e não mesodermis. Também tem a capacidade de migrarem para os tecidos do corpo danificados (Zahorec *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2009).

O tecido mais estudado proveniente destas células é a medula óssea, sendo um dos principais sítios doadores destas células (Bydlowsk *et al.*; Monteiro *et al.*, 2009).

As características deste tipo de células que permitem a cicatrização das feridas incluem: a sua capacidade de migrar para o local da lesão ou inflamação; participam na regeneração de tecidos lesados; estimulam a proliferação e diferenciação das células progenitoras residentes; incrementam a recuperação das células lesionadas através da secreção de fatores de crescimento e remodelação da matriz (Hanson *et al.*, 2010).

As células tronco mesenquimais reparam os tecidos através do seu potencial de diferenciação em células funcionais o que coopera para a recuperação do microambiente. Muitas vezes as células tronco presentes no organismo não são capazes de regenerar os tecidos lesionados devido ao grau da lesão e da cronicidade da doença. Um inconveniente destas células é que com o avançar da idade a sua quantidade diminui no organismo e nestas situações existe a necessidade de recorrer à engenharia de tecidos (Morais e Wenceslau, 2009).

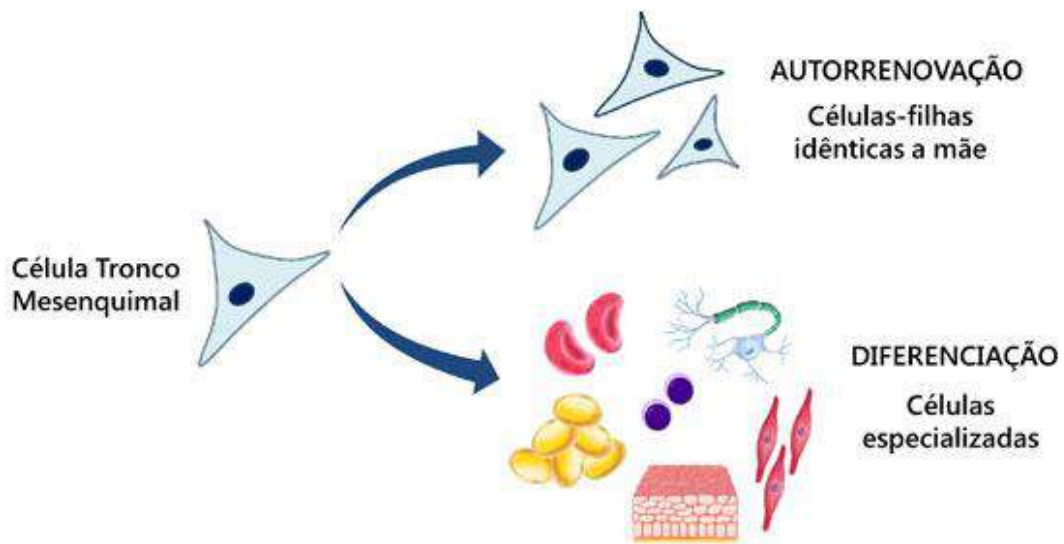


Figura 6 - Ilustração das propriedades das células tronco mesenquimais (adaptado de Morais e Wenceslau, 2009)

A figura 6 representa três características que diferenciam estas células de todas as outras (Morais e Wenceslau, 2009):

- São células indiferenciadas, o que significa que não apresentam uma função específica podendo ser designadas por “células neutras”;
- Estas podem-se diferenciar em determinadas condições específicas, o que permite começarem a ter funções especializadas. Um exemplo deste acontecimento é quando uma célula tronco recebe um estímulo para se transformar numa célula muscular ou óssea;
- Como têm a capacidade de autorrenovação geram células-filhas idênticas às células-mãe, ou seja, as células tronco dão origem a novas células tronco que mantêm o potencial de se multiplicar e de se diferenciar.

5.2. Potencial regenerativo das células tronco mesenquimais em feridas crônicas

O poder regenerativo destas células deve-se a duas características: à sua capacidade de auto-renovação o que permite serem capazes de se multiplicar mantendo o seu estado indiferenciado facultando uma reposição ativa da sua população de uma forma constante nos tecidos e a sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Bydlowsk *et al.*).

Este tipo de células apresenta um potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, tendo uma elevada sensibilidade a moléculas sinalizadoras específicas o que permite o seu fácil manuseamento *in vitro*. Isto faz com que as células tronco mesenquimais sejam uma ferramenta muito importante na engenharia de tecidos abrangendo a regeneração de tecidos *in vivo* e a produção dos mesmos *in vitro* (Caplan e Bruder, 2001; Bruder *et al.*, 1994).

As células tronco mesenquimais encontram-se presente nas quatro fases do processo de cicatrização de feridas. Estas células atuam por processos de transporte ativo, pela diferenciação e incorporação de tecido danificado, por promoção da angiogenese (crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos que já existem) e também por propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas. Outro mecanismo que estas células utilizam é produzir moléculas biologicamente ativas que são os fatores solúveis que levam a ativação das células residentes, influenciando o ambiente local. Este tipo de células apresentam atividade antimicrobiana significativa o que é imprescindível para a cura de feridas infetadas (Zahorec *et al.*, 2014).

5.3. Substitutos biológicos cutâneos

Atualmente existem três opções de tratamento para as feridas crônicas que causam grandes perdas de pele, estes são: os substitutos cutâneos de pele humana ou de origem sintética. Os de origem de pele humana podem ser designados por aloenxertos quando

são derivados da pele de um cadáver e xenoenxertos se forem provenientes de pele de animais. Os substitutos que são construídos pela engenharia de tecidos são os sintéticos (Ferreira *et al.*, 2011).

A designação de substitutos cutâneos é atribuída a um grupo heterogêneo de elementos biológicos e/ou sintéticos que permitem a oclusão temporária ou permanente das feridas (Ferreira *et al.*, 2011).

Nos últimos 25 anos foram realizados grandes esforços para desenvolver substitutos biológicos de pele humana, isto só foi possível através dos avanços científicos da engenharia de tecidos. Os substitutos biológicos que foram criados até ao presente têm como utilidade: na promoção da cicatrização de feridas agudas e crônicas e como sistema de testes *in vitro* na investigação farmacêutica (Groeber *et al.*, 2011).

O objetivo dos substitutos de pele é facilitar a cicatrização mais rápida e promover o desenvolvimento de um novo tecido que seja semelhante a nível estrutural e funcional em comparação com o tecido humano ileso (Clark *et al.*, 2007).

Um substituto de pele ideal deve apresentar uma vascularização rápida e adequada após o transplante (Bottcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Existem diversas classificações de produtos substitutos de pele atualmente disponíveis (Shevchenko *et al.*, 2010):

1. Estrutura anatómica (que pode ser de três tipos: a dermo-epidérmica, epidérmica e dérmica);
2. A duração do substituto no local da lesão: permanente, semi-permanente e temporário;

3. Origem celular (autóloga, alogénica e xenogénica);
4. O substituto de pele pode apresentar componentes celulares ou acelulares;
5. O local onde sucede a ligação primária ao biomaterial pode ser *in vivo* ou *in vitro*.

A classificação mais utilizada atualmente é a anatômica (Shevchenko *et al.*, 2010). Com base nessa classificação o parágrafo seguinte vai se basear nos substitutos anatômicos que devem ser utilizados para o tratamento das feridas crônicas.

Os substitutos dermo-epidérmicos aplicados *in vivo* são os mais completos no mercado porque conseguem substituir as duas camadas da pele (epiderme e derme). A utilidade destes produtos é essencialmente para o tratamento de feridas crônicas (Groeber *et al.*, 2011; Bottcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Foram realizados estudos sobre este tipo de substitutos biológicos no tratamento de feridas crônicas nos quais se permitiu concluir que indivíduos que foram tratados com substitutos dermo-epidérmicos manifestaram uma rápida e boa cicatrização das feridas. Também foram executados ensaios clínicos para equiparar as cicatrizes cedidas após o tratamento convencional e o tratamento com substitutos dermo-epidérmicos, evidenciando-se nestes últimos uma menor cicatriz com melhor aspeto (Bottcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Existem duas desvantagens em relação a este tipo de substitutos: têm um elevado tempo de espera, cerca de 4 semanas desde a biopsia até a sua transplantação e exigem um elevado custo de fabrico (Bottcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Os produtos que existem no mercado deste tipo de substitutos contêm células autólogas e alogênicas (queratinócitos e fibroblastos) incorporadas em suportes apropriados, mas são considerados substitutos temporários (Bottcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Existem três produtos no mercado comercializados: o Apligraf®, o Orcell® e o TissueTech Autograft System® (Groeber *et al.*, 2011).

O Apligraf® é constituído por duas partes, a primeira parte trata-se de fibroblastos alogênicos vivos que são colocados numa matriz de colagénio bovino tipo I a crescer, isto faz a substituição da derme. A segunda parte corresponde à substituição da epiderme, é composta pela multiplicação e diferenciação dos queratinócitos alogênicos vivos. É indicado para o tratamento de úlceras crônicas (venosas e diabéticas). O objetivo deste produto é fornecer os componentes da matriz extracelular, as citoquinas, os fatores de crescimento e os interferões ao leito da ferida. É um substituto temporário, porque as células alogênicas deste produto não conseguem sobreviver dois meses *in vivo*. Mas este produto comercializado faculta a aplicação de um novo substituto entre quatro a seis semanas segundo as indicações médicas. Este substituto é o mais parecido com a pele humana mas ainda não contém células langerhans, macrófagos, linfócitos, vasos sanguíneos e anexos cutâneos (Groeber *et al.*, 2011; Shevchenko *et al.*, 2010; López *et al.*, 2006).

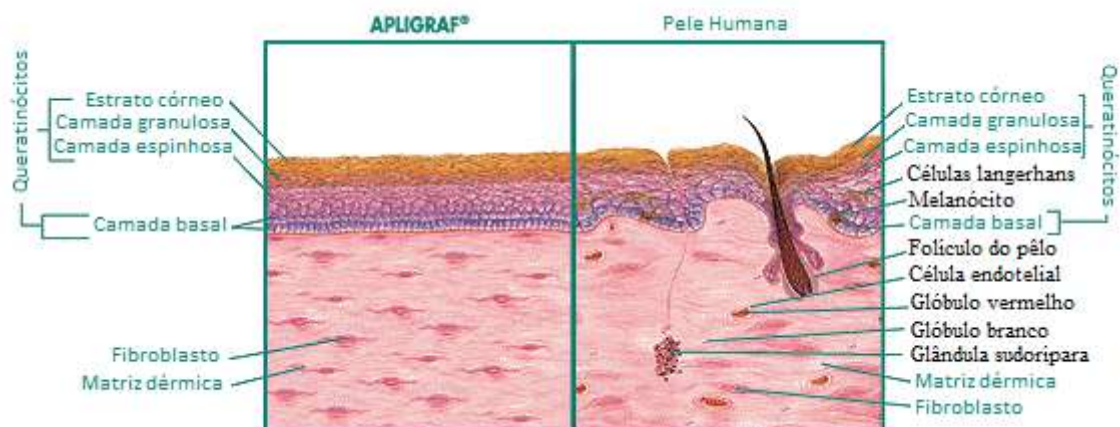


Figura 7 - Imagem ilustrativa em que compara um substituto biológico dermo-epidérmico (apligraf) com a pele humana natural (adaptado de Kim *et al.*, 2000b)

O Orcell® baseia-se em semear fibroblastos alogénicos numa esponja de colagénio bovino tipo I em que são revestidos por colagénio em gel não poroso, adicionando-se os queratinócitos alogénicos por cima deste revestimento, formando-se assim uma camada confluenta. Este produto tem como função produzir citoquinas e fatores de crescimento que sejam favoráveis para aumentar migração de células e a cicatrização de feridas. Este substituto de pele artificial apresenta uma cicatriz reduzida, um tempo de cicatrização curto e é considerado um produto temporário porque é reabsorvido entre sete a catorze dias (Shevchenko *et al.*, 2010).

O TissueTech Autograft System® é o único produto comercializado até ao presente que é utilizado como permanente, porque é constituído por fibroblastos e queratinócitos autólogos que são cultivados em membranas microperfuradas de ácido hialurónico. Este sistema é constituído por dois substitutos, o Hyalograft® que é um substituto dérmico e o Laserkin® que é um substituto epidérmico. Como TissueTech Autograft System® inclui dois substitutos que tem de ser aplicados consecutivamente na ferida, este não pode ser considerado um substituto de pele dermo-epidérmica “verdadeiro” (Groeber *et al.*, 2011).

Existe um produto que ainda não está comercialmente disponível, porque ainda se encontra em estudo, mas assegura ser muito promissor baseando-se numa esponja de colagénio que é semeada com fibroblastos e queratinócitos autólogos. Este substituto também permite a sua aplicação permanente podendo ser descrito como um substituto de pele dermo-epidérmica “verdadeiro”. A sua designação é PermaDerm ou Cincinnati Shriners (Groeber *et al.*, 2011).

Os substitutos de pele dermo-epidérmica pretendem obter uma pele artificial com as duas camadas da pele incorporadas (epiderme e derme). Sendo estes os produtos mais avançados e rebuscados mas também os mais dispendiosos economicamente que foram produzidos pela engenharia de tecidos biológicos para a reparação de tecidos (Shevchenko *et al.*, 2010).

A utilização de substitutos biológicos de pele produzidos *in vitro* é muito relevante pelo facto de proporcionar uma composição celular suscetível de ser manipulada pelo investigador, possibilitando a adaptação dos substitutos conforme o estudo em questão. Os substitutos biológicos criados podem ser empregados na realização de testes e modelos de estudo *in vitro* sendo uma boa alternativa aos testes de estudo em métodos convencionais em termos de custo-efetividade (Groeber *et al.*, 2011).

Um substituto dermo-epidérmico ideal deve conter as seguintes características: suportar hipoxia; ampla disponibilidade; presença de componentes dérmicos e epidérmicos; reologia comparável à da pele; resistência à infecção; custo/benefício adequado; facilidade de preparação; baixa antigenicidade; facilidade de armazenamento e resistência à tensão de corte (Ferreira *et al.*, 2011).

Atualmente os substitutos cutâneos têm um elevado interesse para a cirurgia plástica sendo principalmente utilizados no tratamento de feridas crônicas, uma vez que conseguem impulsionar a qualidade de vida dos indivíduos com este tipo de feridas e aumentar a taxa de sobrevivência de pacientes com zonas lesionadas bastante extensas que possam levar a morte deste. Apesar deste avanço tecnológico, os substitutos cutâneos que estão comercializados não contêm determinados componentes celulares como por exemplo: macrófagos, linfócitos, melanócitos e anexos cutâneos o que não os possibilita executar a total funcionalidade da pele (Ferreira *et al.*, 2011; Groeber *et al.*, 2011).

VI. Conclusão

A utilização recente de células tronco mesenquimais permitiu identificar que este tipo de células tem a capacidade de se auto-regenerar e de se diferenciar num elevado número de células especializadas no organismo humano. Devido a esta descoberta a engenharia de tecidos consegue regenerar tecidos lesados ou órgãos utilizando as células tronco mesenquimais, isto permitiu que a engenharia de tecidos evolui-se para uma das maiores áreas da medicina regenerativa.

A engenharia de tecidos consiste num conjunto de técnicas para a reconstrução de novos tecidos e órgãos, através dos conhecimentos das áreas de ciência e engenharia de materiais, biológica e médica.

Apesar da engenharia de tecidos apresentar grandes perspectivas de comercialização de novos produtos, esta também tem as suas limitações. O progresso das técnicas de cultura de células e dos suportes empregados ainda não possibilitam que os tecidos sejam produzidos com toda a sua complexidade (o facto de não conterem determinados componentes celulares, anexos cutâneos e uma deficiente vascularização).

Atualmente já existem muitos casos em que pacientes aplicam substitutos cutâneos *in vivo* para o tratamento de feridas crônicas, apresentando assim resultados positivos.

Os substitutos cutâneos também evoluíram muito na sua aplicabilidade *in vitro*, por serem extremamente vantajosos na investigação, permitindo testar a toxicidade destes e servindo como modelo de estudo da fisiologia de vários tipos de doenças dermatológicas.

Com este trabalho de pesquisa bibliográfica conclui-se que a engenharia de tecidos será uma área muito promissora no futuro, uma vez que necessita de novos campos de investigação para obter um maior impacto em relação à prática de cuidados de saúde.

VII. Bibliografia

Abbade, L. e Lastória, S. (2006). Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. *An Bras Dermatol*, 81, pp. 509-522.

Alvarez, O.; Kalinski, C.; Nusbaum, J., *et al.* (2007). Incorporating wound healing strategies to improve palliation (symptom management) in patients with chronic wounds. *Journal Palliat Med*, 5.

Bajada, S.; Mazakova, I.; Richardson, J., *et al.* (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2, pp. 169-183.

Barbanti, S. e Zavaglia, C. (2005). Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, pp. 13-21.

Barrère, F.; Mahmood, T.; Groot, K., *et al.* (2008). Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Elsevier*, 59, pp. 38-71.

Berthiaume, F.; Maguire, T. e Yarmush, M. (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Reviews of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, pp. 403-430.

Bhat, S. e Kumar, A. (2012). Biomaterials in Regenerative Medicine. *JAYPEE* 46, pp. 81-89.

Bottcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T. e Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *BURNS*, 36, pp. 450-460.

Brasileiro, J.; Oliveira, W.; Monteiro, L., *et al.* (2005). Pé diabético: aspectos clínicos. *J Vasc Br*, 4, pp. 11-21.

Bruder, S.; Fink, J. e Caplan, A. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 56, pp. 283-294.

Bydlowsk, S.; Debes, A.; Maselli, L., *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Hematologia e Hemoterapia*, 1, pp. 25-35.

Caplan, A. e Bruder, S. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine*, 7, pp. 259-264.

Chapekar, M. (2000). Tissue Engineering: challenges and opportunities. *John Wiley & Sons, Inc.* J Biomed Mater Res*, 53, pp. 617-620.

Chen, Q.; Liang, S. e Thouas, G. (2013). Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38, pp. 584-671.

Cheung, H.; Lau, K.; Lu, T., *et al.* (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Elsevier*, 38, pp. 291-300.

Chung, H. e Park, T. (2007). Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 249-262.

Clark, R.; Ghosh, K. e Tonnesen, M. (2007). Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, pp. 1018–1029.

Daar, A. e Greenwood, H. (2007). A proposed definition of regenerative medicine *tissue engineering and regenerative medicine*, 1, pp. 179-184.

Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T., *et al.* (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, pp. 1-19.

Esteves, J.; Baptista, A.; Rodrigo, F., *et al.* (1992). Dermatologia. In: Gulbenkian, F. C. (Ed.) *Biologia cutânea*. 2º Edição ed. Lisboa. pp. 7-134.

Ferreira, H.; Silva, H. e Rodrigues, L. (2012). Magnetic Resonance Imaging - a powerful tool for Tissue Engineering. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 2, pp. 159-165.

Ferreira, M.; Paggiaro, A.; Isaac, C., *et al.* (2011). Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. *Cirurgia plástica*, 4, pp. 696-702.

Flegg, A.; Mcelwain, S.; Byrne, M., *et al.* (2009). A three species model to simulate application of hyperbaric oxygen therapy to chronic wounds. *PLoS Comput Biol*, 5, pp. 1-12.

Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M., *et al.* (2011). Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128, pp. 352-366.

Hanson, S.; Bentz, M. e Hematti, P. (2010). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Nonhealing Cutaneous Wounds. *Plast Reconstr Surg*, 2, pp. 510-516.

Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *The Royal Society Interface*, 3, pp. 589-599.

Jacob, W.; Francone, A. e Lossow, J. (1990). *Anatomia e fisiologia humana*. Rio de Janeiro.

James, A.; Swogger, E.; Wolcott, R., *et al.* (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Rep Reg*, 16, pp. 37-44.

Kim, B.; Baez, C. e Atala, A. (2000a). Biomaterials for tissue engineering. *Springer*, 18, pp. 2-9.

Kim, M.; Law, J.; Lee, M., *et al.* (2000b). *Bioengineered Skin and Wound Healing* [Em linha]. Disponível em <http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group07/structural/struct04.html> [Consultado em 18-07-2015].

- Lanza, R.; Langer, R. e Vacanti, J. (2007). *Principles of Tissue Engineering*. London, Elsevier.
- Laureano, A. e Rodrigues, A. (2011). CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. *Revista da SPDV*, 69, pp. 355-367.
- Liu, C.; Xia, Z. e Czernuszka, J. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, pp. 1051-1064.
- López, E.; Acosta, M. e Díaz, M. (2006). ARTIFICIAL SKIN. *Tecnologías de Avanzada*, 2, pp. 41-47.
- Mason, C. e Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regen. Med.*, 3, pp. 1-5.
- Monteiro, B.; Neto, N. e Carlo, R. (2009). Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*.
Morais, B. e Wenceslau, C. (2009). *A biotecnologia das células tronco ao seu alcance* [Em linha]. Disponível em <<http://www.regeneravet.com.br/novo/index.php/cientifico/celulas-tronco>> [Consultado em 11/07/2015].
- Nerem, R. (2010). Regenerative medicine: the emergence of an industry. *The Royal Society Interface*, 7, pp. S771-S775.
- Oliveira, C.; Nascimento, M.; Junior, E., et al. (2010). Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9, pp. 28-36.
- Park, J. e Lakes, R. (2007). *Biomaterials an introduction*. USA, Springer.
- Partap, S.; Plunkett, N. e O'brien, O. (2010). Bioreactors in Tissue Engineering. In: Eberli, D. (Ed.) *Tissue Engineering*. InTech. pp. 323-336.
- Philippe, F. (1994). *A pele e o seu envelhecimento* Lisboa.
- Polak, D. (2010). Regenerative medicine. Opportunities and challenges: a brief overview. *The Royal Society Interface* 7, pp. S777-s781.
- Ratner, B.; Hoffman, A.; Schoen, F., et al. (2013). *Biomaterials science*. USA, Elsevier.
- Rocha, J.; Cunha, P.; Dinis, P., et al. (2006). Feridas uma arte secular avanços tecnológicos no tratamento da feridas. Portugal.
- Rocha, J.; Miranda, M. e Andrade, M. (2006). Abordagem terapêutica das úlceras de pressão. *Acta Med Port*, 19, pp. 29-39.
- Santos, A. e Wada, M. (2007). Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 17, pp. 308-317.

Santos, V.; Menoita, E.; Gomes, C., *et al.* (2012). Cicatrização em feridas: a particularidade das feridas crônicas/estagnadas *Journal of Agind and Innovation*, 1.

Scheper, T. (2006). *Tissue Engineering I*. New York, Springer.

Seeley, R.; Stephens, T. e Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia*. McGraw-Hill.

Shevchenko, R.; James, S. e James, S. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal the royal society*, 7, pp. 229-258.

Stadelmann, W.; Digenis, A. e Tobin, G. (1998). Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds. *Excerpta Medica*, 176, pp. 26S–38S.

Verma, A. e Singh, A. (2014). *Animal Biotechnology*. United States, Elsevier.

Werdin, F.; Tennenhaus, M.; Schaller, E., *et al.* (2009). Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Journal of Plastic Surgery*, 9, pp. 160-179.

Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S. (2008). Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. *StemBook* pp. 1-18.

Williams, D. (2008). Biomaterials. *Elsevier*, 29, pp. 2941–2953.

Zahorec, P.; Koller, J.; Danisovic, L., *et al.* (2014). Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. *Cell Tissue Bank*.