MÁRCIA MAYUMI OMI SIMBARA

**Fabricação e caracterização de um protótipo de arcabouço para engenharia tecidual de
válvulas cardíacas**

São Paulo

2019

MÁRCIA MAYUMI OMI SIMBARA

**Fabricação e caracterização de um protótipo de arcabouço para engenharia tecidual de
válvulas cardíacas**

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de
Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Medicina, Tecnologia e Intervenção em
Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Aron José Pazin de Andrade

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Malmonge

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca do IDPC.

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Simbara, Márcia Mayumi Omi

Fabricação e caracterização de um protótipo de arcabouço para engenharia tecidual de válvulas cardíacas / Márcia Mayumi Omi Simbara. – São Paulo, 2019.

Tese (doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo
Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em
Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Aron José Pazin de Andrade
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Malmonge

Descritores: 1. Valvas Cardíacas. 2. Engenharia Tecidual. 3. Materiais Biocompatíveis.

USP/IDPC/Biblioteca/095/19

Nome: SIMBARA, Márcia Mayumi Omi

Título: Fabricação e caracterização de um protótipo de arcabouço para engenharia tecidual de válvulas cardíacas

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de
Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família por tudo. Simplesmente e absolutamente tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aron Jozé Pazin de Andrade, pelo empenho em tornar este trabalho o melhor possível e por acreditar na minha capacidade.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Malmonge, com a qual tenho o prazer e a honra de trabalhar desde a Iniciação Científica. Agradeço não só pela paciência, a compreensão, o incentivo e os ensinamentos, mas também por ser um exemplo de mulher, professora, pesquisadora e amiga.

Aos meus companheiros do Centro de Engenharia em Assistência Circulatória (CEAC) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, e também do Laboratório de Biomateriais da Universidade Federal do ABC (UFABC), pela companhia e incentivo constante. Não incluo nomes porque são muitos e, certamente, eu falharia em lembrar todos eles.

A todos os meus colaboradores, que incluem, porém não se limitam a: o Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr. (UFABC) e sua aluna Juliana Rosa, Eng. Dr. Ovandir Bazan, o Departamento de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação (CTI) Renato Archer, o Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP).

Agradeço também à Central Experimental Multiusuário da UFABC pela infraestrutura utilizada no trabalho, e aos seus técnicos pelo auxílio.

Agraço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e pela verba para compra de consumíveis.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP - Parte IV (Vancouver); 3ª edição - São Paulo: 2016. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. A valva aórtica	7
3.2. Doenças valvares	9
3.3. Histórico e quadro atual das próteses valvares	12
3.4. Engenharia Tecidual e a Engenharia Tecidual de Valvas Cardíacas.....	17
3.4.1. Arcabouços descelularizados.....	20
3.4.2. Polímeros sintéticos.....	20
3.4.3. Polímeros naturais	21
3.4.4. Arcabouços híbridos	22
3.4.5. Estado da arte e desafios atuais	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Otimização do protótipo	26
4.2. Fabricação do protótipo	28
4.2.1. Suporte do protótipo (<i>stent</i>).....	28
4.2.2. Folhetos	29
4.3. Caracterizações das amostras.....	30
4.3.1. Espectroscopia por infravermelho (FTIR).....	30
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
4.3.3. Quantificação do alinhamento e diâmetro das fibras.....	31
4.3.4. Ensaio de tração	31
4.3.5. Ângulo de contato.....	32
4.3.6. Desempenho Biológico	32
4.4. Processo de esterilização e validação da esterilidade	33
4.4.1. Processo de esterilização	33
4.4.2. Metodologia de validação da esterilidade	33
4.5. Desempenho hidrodinâmico do protótipo.....	36
5. RESULTADOS	40
5.1. Otimização do protótipo	40
5.2. Fabricação do protótipo	42
5.2.1. <i>Stent</i>	42
5.2.2. Folhetos	43

5.3.	Validação da esterilização das amostras	44
5.4.	Caracterização das amostras e comparação	46
5.4.1.	FTIR	46
5.4.2.	MEV	47
5.4.3.	Quantificação do alinhamento e diâmetro das fibras.....	49
5.4.4.	Ensaio de tração	53
5.4.5.	Ângulo de contato.....	54
5.4.6.	Desempenho biológico	54
5.5.	Desempenho hidrodinâmico	56
6.	DISCUSSÃO	58
7.	CONCLUSÕES	62
8.	TRABALHOS FUTUROS	63
9.	PUBLICAÇÕES	64
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Lista de ilustrações

Figura 1. Desenhos esquemáticos mostrando A) as câmaras do coração e as VC durante a diástole (relaxação dos ventrículos) e B) as VC durante a sístole (contração dos ventrículos). 1	
Figura 2. Representação gráfica de casos de estenose e regurgitação das VC do lado esquerdo do coração. Estes problemas podem ocorrer em apenas uma valva ou em mais de uma. 2	
Figura 3. Exemplos atuais dos tipos de próteses mais comumente utilizados. 3	
Figura 4. Desenho esquemático da raiz aórtica e seus componentes. 7	
Figura 5. Desenho esquemático das estratificações dos folhetos valvares e corte histológico de um folheto nativo de VA. 8	
Figura 6. Exemplos atuais de TAVR. 14	
Figura 7. Exemplos atuais de próteses de liberação rápida/sem suturas. 15	
Figura 8. Aspectos macroscópicos (A) do arcabouço de PC-BU eletrofiado e (B) do explante após 12 meses de implantação (posição pulmonar, em ovelhas). 23	
Figura 9. Fluxograma que resume as principais etapas do projeto. 25	
Figura 10. Geometria do <i>stent</i> elaborada em software de CAD. 27	
Figura 11. Modelo de elementos finitos do <i>stent</i> 27	
Figura 12. Condições de contorno utilizadas no modelo de EF. Os planos indicam as regiões fixas e a seta, o local de aplicação e a direção da força aplicada (radial). 28	
Figura 13. Fluxograma mostrando a primeira etapa do processo de validação da esterilização (validação dos meios de cultura e da esterilização dos mesmos). 34	
Figura 14. Fluxograma mostrando a validação do processo de esterilização propriamente dita (cultura das amostras esterilizadas). 36	
Figura 15. Saia de PET costurada ao longo do <i>stent</i> para fixação no equipamento de ensaio hidrodinâmico. 37	
Figura 16. (A) Configuração experimental utilizada para a avaliação hidrodinâmica do arcabouço em diferentes vistas (S = scaffold e VA = valva aórtica) e (B) posicionamento das próteses no simulador. 38	
Figura 17. Resultado da otimização topológica aplicada ao <i>stent</i> 40	
Figura 18. <i>Stent</i> curvo confeccionado em software CAD. 40	
Figura 19. Tensões de von Mises obtidas para os dois modelos de <i>stent</i> 41	
Figura 20. Resultados da impressão do <i>stent</i> em PCL, vistas em perspectivas diferentes. 42	
Figura 21. Resultados da impressão do <i>stent</i> em PLA, vistas em perspectivas diferentes. 43	

Figura 22. Fotografia do protótipo finalizado, com os folhetos depositados sobre o <i>stent</i> (e sobre o bordelete de PET).	43
Figura 23. Fotografia das amostras após a esterilização, ainda na embalagem utilizada no processo.	44
Figura 24. Fotografia de amostras retangulares das membranas esterilizadas (triplicata), imersas em meio de cultura (A) caseína de soja e (B) tioglicolato, após cultura em estufa. ...	45
Figura 25. Fotografia do protótipo esterilizado, imerso em meio de cultura (A) caseína de soja e (B) tioglicolato, após cultura em estufa (uma metade em cada tubo).....	45
Figura 26. Espectro de FTIR do PCL fornecido pela Sigma-Aldrich.	46
Figura 27. Espectros médios (n = 3) de FTIR das amostras antes e depois da esterilização*	46
Figura 28. Micrografia capturada com uma magnificação baixa, permitindo observar distribuição das fibras na amostra.	47
Figura 29. Micrografia evidenciando a formação de feixes de fibras nas amostras.....	48
Figura 30. Micrografia ressaltando a morfologia das partículas encontradas em meio às fibras.	48
Figura 31. Micrografia mostrando a microestrutura de uma amostra esterilizada.	49
Figura 32. Análise qualitativa do alinhamento das fibras nas amostras não esterilizadas (1A e 1B) e após a esterilização (2A e 2B), em duas regiões diferentes. Cada cor representa um ângulo diferente, conforme mostra a legenda. Barra de escala em micrometros (µm). Abaixo delas, os respectivos gráficos que mostram a quantificação do alinhamento.	50
Figura 33. Gráficos detalhados da distribuição do alinhamento das amostras esterilizadas e não esterilizadas, com as informações mais relevantes em destaque.	51
Figura 34. Histogramas da distribuição dos diâmetros das fibras antes e depois da esterilização.	52
Figura 35. Curvas médias de tensão X deformação sob tração (com desvio) das amostras, obtidas em duas direções perpendiculares entre si. As amostras não esterilizadas são representadas pelas curvas com símbolos quadrados, e as não esterilizadas, por símbolos triangulares.	53
Figura 36. Análise morfológica e citoquímica das células Vero cultivadas sobre a manta fibrosa não esterilizada e sobre a manta esterilizada. CV = cristal violeta, AT = azul de toluidina, XP = xilidina ponceau. Barra de escala: 50 µm.	55
Figura 37. Mapa de vetores de velocidade no plano xy durante a diástole para a prótese da St. Jude Medical e o arcabouço. As linhas pretas contínuas enfatizam vórtices no eixo z.....	56

Figura 38. Mapas de vetores de velocidade obtidos durante o pico de pressão na sístole. 57

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Principais componentes dos folhetos da VA, com suas respectivas localizações e funções que exercem para o funcionamento das valvas.	9
Quadro 2. Resumo das principais vantagens e desvantagens dos substitutos valvares atuais.	16
Quadro 3. Resumo das vantagens e desvantagens dos principais tipos de arcabouço utilizados na ET.	19
Quadro 4. Dados referentes aos micro-organismos utilizados para validar o processo de esterilização.	35
 Tabela 1. Informações numéricas referentes ao diâmetro das fibras das amostras.	 52

Lista de abreviaturas e siglas

AT – azul de toluidina

ATR – do inglês, *attenuated total reflexion*

CAD – do inglês, *computer aided design*

CCD – do inglês, *charged-couple device*

CME – Centro de Material e Esterilização

CTI – Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer

CV – cristal violeta

CVA – calcificação da valva aórtica

DCV – doenças cardiovasculares

DV – doenças valvares

EAO – estenose aórtica

EF – elementos finitos

EI – endocardite infecciosa

ET – engenharia tecidual

ETVC – engenharia tecidual de valvas cardíacas

FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*

FDM – do inglês, *fused deposition modeling*

FR – febre reumática

FSS – fiação por sopro em solução

FTIR – do inglês, *Fourier tranform infrared spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho)

GAG – glicosaminoglicanas

HC – homoenxertos criopreservados

ISO – International Organization for Standardization

MA – manufatura aditiva

MEC – matriz extracelular

MEF – método de elementos finitos

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MOT – método de otimização topológica

OMS – Organização Mundial de Saúde

P4HB – poli(4-hidroxibutirato)

PC-BU – policarbonato bis-ureia-modificado

PCL – poli (ϵ -caprolactona)

PDLLA – poli(D,L-ácido láctico)

PET – poli(tereftalato de etileno)

PGA – poli(ácido glicólico)

PGS – poli(glicerol sebacato)

PLA – poli(ácido láctico)

PLGA – poli(ácido láctico-co-glicólico)

PMMA – poli(metil metacrilato)

PIV - do inglês, *particle image velocimetry* (velocimetria por imagem de partículas)

PU – poliuretano

PUC-SP – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo

SBA – Sociedade Brasileira de Anatomia

SFB – soro fetal bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TAVR – do inglês, *transcatheter aortic valve replacement*

UV - ultravioleta

VA – valva aórtica

VAB – valva aórtica bicúspide

VC – valvas cardíacas

VM – valva mitral

VP – valva pulmonar

VT – valva tricúspide

XP – xilidina ponceau

RESUMO

Simbara MMO. Fabricação e caracterização de um protótipo de arcabouço para engenharia tecidual de válvulas cardíacas [Tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Universidade de São Paulo; 2019.

Estima-se que, em 2050, o número de pacientes ao redor do mundo que precisarão de substituições valvares chegue a 850 mil por ano. As próteses atuais (mecânicas e biológicas) apresentam bons resultados, porém são incapazes de crescer com os pacientes. A engenharia tecidual aparece como promessa para resolução deste problema, pois visa à criação de um substituto vivo. O presente trabalho teve como objetivo fabricar e caracterizar um novo arcabouço polimérico biorreabsorvível para engenharia tecidual de valvas cardíacas, além de encontrar um processo de esterilização eficaz para viabilizar seu uso como dispositivo implantável. O arcabouço, inicialmente projetado para valvas semilunares, foi baseado no formato das próteses biológicas, sendo composto por um anel rígido, denominado *stent* (cujo formato foi otimizado através do método de otimização topológica) e três folhetos flexíveis. Os processos de fabricação e materiais escolhidos para a confecção do arcabouço foram: a manufatura aditiva em poli(ácido láctico) (PLA) para o *stent*, e a técnica de fiação por sopro em solução com poli(ϵ -caprolactona) (PCL) para os folhetos. Primeiramente, foram fabricadas amostras, utilizando as mesmas técnicas e materiais mencionados, em formato simplificado (retangular). Estas foram submetidas a caracterizações químicas, mecânicas, morfológicas e de desempenho biológico. A esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio foi então testada e validada, e as amostras estéreis foram caracterizadas da mesma maneira, para verificar se este processo causou alguma alteração. Posteriormente, um protótipo completo foi fabricado e seu desempenho hidrodinâmico foi avaliado. Os resultados mostraram que o processo de esterilização cumpriu seu propósito sem alterar as propriedades analisadas do arcabouço. O desempenho hidrodinâmico foi considerado satisfatório, dado que o arcabouço suportou pressões de até 120 mmHg por mais de 30 minutos, indicando assim que o *design* e os materiais escolhidos são adequados. Tais resultados indicam que o arcabouço pode, em breve, seguir para a cultura celular em biorreator, onde espera-se obter uma estrutura com organização tecidual semelhante à da valva nativa.

Palavras-chave: valvas cardíacas, engenharia tecidual, biomateriais.

ABSTRACT

Simbara MMO. Fabrication and characterization of a scaffold prototype for heart valve tissue engineering [Thesis]. São Paulo: “Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Universidade de São Paulo”; 2019.

The annual number of patients requiring valve replacement surgeries worldwide is projected to reach 850,000 by the year 2050. While current prosthetic valves (mechanical and biological) offer good results, they are cannot grow with the patients. Tissue engineering represents a promising alternative to solve this problem, because it aims to create living substitutes. The present work aimed to fabricate and characterize a new bioresorbable polymer scaffold for heart valve tissue engineering, as well as to find an effective sterilization process to allow its use as an implantable device. The scaffold, initially intended for use as a semilunar valve, was based on the shape of biological valves, and was composed of a rigid ring, called stent (whose shape was optimized using the topological optimization method) and three flexible leaflets. The fabrication techniques and materials chosen to produce the scaffold were: additive manufacturing with poly(lactic acid) (PLA) for the stent, and solution blow spinning with poly(ϵ -caprolactone) (PCL) for the leaflets. Firstly, samples were fabricated using the aforementioned techniques and materials, but in a simpler shape (rectangular). They were then characterized as to their chemical composition, mechanical properties, microstructure and biological performance. Hydrogen peroxide plasma sterilization was then tested and validated, and the sterilized samples were characterized in the same way to verify whether the process had caused any modification. After that, a complete prototype was produced, and its hydrodynamic performance was evaluated. Results showed that the sterilization process fulfilled its goal without having caused any negative changes in the analyzed scaffold properties. Hydrodynamic performance was considered satisfactory, given that the scaffold withstood pressures of up to 120 mmHg for more than 30 minutes, which indicated the chosen design and materials are adequate. Such results suggest that this scaffold may soon be able to proceed to cell culture in a bioreactor, where hopefully a structure with native-like tissue organization will be obtained.

Keywords: heart valves, tissue engineering, biomaterials.

1. INTRODUÇÃO

Valvas cardíacas (VC) são estruturas responsáveis por manter o fluxo unidirecional do sangue através do sistema cardiovascular. O coração humano possui quatro valvas: duas que controlam o fluxo para os ventrículos, as atrioventriculares (valvas mitral e tricúspide –VM e VT); e duas semilunares, que controlam o fluxo para as circulações pulmonar e sistêmica (valvas pulmonar e aórtica – VP e VA). Alternativamente, são classificadas como valvas do lado esquerdo (VM e VA) e do lado direito (VT e VP) (Figura 1) (1,2).

Figura 1. Desenhos esquemáticos mostrando A) as câmaras do coração e as VC durante a diástole (relaxação dos ventrículos) e B) as VC durante a sístole (contração dos ventrículos).

Fonte: (3)

As VC podem funcionar durante muitos anos sem apresentar problemas, mesmo sendo submetidas a solicitações mecânicas severas. Suportar o fluxo sanguíneo (de 5 litros por minuto em média), as pressões (de 120 mmHg no lado esquerdo, em um indivíduo saudável) e o ciclo de abertura/fechamento (que ocorre mais de 30 milhões de vezes por ano) só é possível devido ao remodelamento e a renovação constantes promovidos pelas células (1).

Existem várias doenças que podem prejudicar o funcionamento das VC, resultando ou em uma obstrução ao fluxo (estenose), ou em um fluxo contrário ao desejado (regurgitação) – em ambos os casos, o agravamento dessas condições leva à necessidade de tratamento ou de uma intervenção cirúrgica (2) (Figura 2). A VA é uma das mais afetadas por doenças, e a mais frequentemente substituída (4).

Figura 2. Representação gráfica de casos de estenose e regurgitação das VC do lado esquerdo do coração. Estes problemas podem ocorrer em apenas uma valva ou em mais de uma.

Fonte: (3)

Mesmo tendo um forte impacto na circulação sanguínea, as doenças valvares (DV) tiveram sua importância ofuscada durante muito tempo, devido à menor prevalência em relação a outras doenças cardiovasculares (DCV), como a doença arterial coronariana e a hipertensão arterial sistêmica. Seu ônus financeiro nos sistemas de saúde também foi negligenciado, pois as DV apresentam altos custos de diagnóstico e tratamento, além de requererem longos períodos de acompanhamento médico (5–7).

Esse cenário, no entanto, vem mudando devido às alterações na epidemiologia das DV ocorridas nas últimas décadas. Atualmente, parte da morbidade e mortalidade atribuídas a DV ainda é devida à febre reumática (FR), cuja incidência é maior em crianças e adolescentes de países em desenvolvimento, inclusive no Brasil (8,9). Já nos países desenvolvidos, o impacto

das DV está mais relacionado a doenças "degenerativas", especialmente a calcificação da VA (CVA) – logo, considerando o envelhecimento da população, esse quadro tende a se agravar a cada ano (6). Por esse motivo, muitos consideram as DV a “próxima epidemia cardíaca”, e muita atenção vem sendo direcionada a este assunto (5,7).

É muito difícil estimar o número global de pacientes que necessitam de substituição de valvas anualmente, por motivos como o acesso limitado da população de países pobres aos serviços de saúde e também a falta de dados/estudos sobre algumas DV nestes países (6,10). No ano de 2013, dados da *American Heart Association* mostram que mais de 100.000 cirurgias valvares (no geral) foram realizadas só nos Estados Unidos (11).

Além da FR e da calcificação da VA, que são adquiridas, existem também as DV congênitas, dentre as quais a valva aórtica bicúspide se destaca por ser a malformação cardíaca mais comum (6). Mesmo corrigidos cirurgicamente, esses tipos de defeitos causam alterações e reações no organismo que eventualmente levam à calcificação da valva em pacientes ainda jovens (1,6). Até hoje, não foram encontrados medicamentos que consigam retardar a progressão da calcificação valvar. Quando o paciente passa a ser sintomático, apesar de existirem algumas alternativas de tratamento, a substituição da valva danificada é o procedimento mais comumente seguido (1,12,13).

No lugar das valvas danificadas, são implantadas as próteses valvares, que são normalmente classificadas em próteses mecânicas e biológicas (Figura 3).

Figura 3. Exemplos atuais dos tipos de próteses mais comumente utilizados.

Fonte: (14), adaptado.

As mecânicas, como a prótese de duplo folheto, são geralmente compostas ou recobertas por carbono pirolítico, e têm como maior vantagem a durabilidade estrutural. No entanto, fatores como o material utilizado e a geometria diferenciada podem induzir a formação de trombos, sendo necessário tratamento vitalício com anticoagulantes (1,15,16).

Já as biológicas têm o *design* baseado em valvas semilunares e possuem três folhetos, que podem ser porcinas ou tecido bovino, e normalmente possuem um suporte estrutural (*stent*) onde os folhetos são costurados. Por serem mais semelhantes em termos de composição e fluxo fisiológicos, não demandam a utilização de anticoagulantes, porém estão sujeitas à falha por degradação e calcificação dos folhetos (1,15,16). Existem outros tipos de próteses consideradas mais avançadas, as próteses transcater (TAVR, do inglês *transcatheter aortic valve replacement*) e as de liberação rápida/sem sutura. Elas também são próteses biológicas (e, portanto, apresentam as mesmas desvantagens mencionadas), porém são montadas sobre estruturas diferentes, que possibilitam uma implantação menos invasiva ou traumática, e por isso costumam ser utilizadas em pacientes idosos, com muitas comorbidades e alto risco cirúrgico.

Apesar das próteses valvares biológicas terem evoluído em termos de hemodinâmica, *design* dos folhetos e tecnologias anticalcificantes, elas ainda costumam apresentar falhas após 10 ou 15 anos de implantação, sendo esse processo ainda mais rápido em pacientes jovens, o que gera a necessidade de reoperações (16–18).

A maior desvantagem apresentada por todos os tipos de prótese atuais, no entanto, é que elas não conseguem acompanhar o crescimento do corpo – problema especialmente crítico para bebês e crianças que necessitam substituição valvar. Para estes casos, há a possibilidade de realizar o chamado procedimento de Ross, que consiste em retirar a VP para substituir a aórtica, e implantar uma prótese no lugar da VP, por ser um local de menor solicitação (1). Essa alternativa, no entanto, não é aplicável para todos os casos, nem sempre funciona e possui muitos riscos e desvantagens (7). A solução definitiva para este problema seria a produção de estruturas semelhantes às valvas nativas, que pudessem crescer junto com o paciente, solução esta que vem a ser a grande promessa da engenharia tecidual (ET).

A ET é a área da ciência popularmente definida como um "campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual" (19). Para realizar esta tarefa, normalmente são utilizados três elementos principais: 1) células, que serão inicialmente

responsáveis pela formação do neotecido; 2) arcabouços biorreabsorvíveis, que fornecem um suporte inicial para as células nele semeadas, desempenhando o papel de uma matriz extracelular (MEC) artificial, e são absorvidos pelo corpo à medida que o tecido é formado; e 3) sinais/estímulos, que podem ser mecânicos, elétricos ou biológicos, e influenciam a diferenciação celular e a organização dos tecidos (20,21).

Durante a década de 1990 e 2000, as pesquisas na área de ET avançaram consideravelmente, com muitos produtos chegando inclusive à comercialização. No entanto, a grande maioria era destinada para tratamento de lesões de pele, ossos e cartilagem (22,23). Já para estruturas mais complexas – como é o caso das VC – o progresso ocorre mais lentamente, e mesmo as pesquisas mais avançadas ainda não alcançaram os testes clínicos (24).

Na engenharia tecidual de valvas cardíacas (ETVC), as principais dificuldades encontradas são: (1) obter uma estrutura com folhetos flexíveis, que não prejudiquem a passagem do fluxo sanguíneo, porém que resistam às solicitações mecânicas sofridas pelas VC; e (2) manter a funcionalidade desta estrutura com o decorrer do tempo, pois muitas vezes há espessamento ou retração dos folhetos conforme o neotecido é formado. Apesar destes desafios, o surgimento de novos materiais e técnicas de fabricação, a crescente contribuição da simulação computacional e as constantes descobertas da biologia celular têm estimulado a pesquisa na área e promovido vários avanços (24,25).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo contribuir com a área de ETVC, propondo um novo modelo de arcabouço biorreabsorvível, inicialmente pensado para substituição de valvas semilunares.

Como objetivos específicos, pretendeu-se:

- produzir um protótipo de arcabouço para valvas cardíacas que seja funcional e suporte as condições mínimas para cultura em biorreator;
- encontrar um processo que seja capaz de esterilizar o protótipo, sem alterar suas propriedades.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A valva aórtica¹

A VA é composta por três folhetos (também chamados de cúspides ou válvulas²), que se encontram presos a um anel fibroso conectado à porção distal da via de saída do ventrículo esquerdo (1). Esses folhetos representam apenas um dos vários componentes da raiz aórtica (Figura 4), a estrutura que conecta o coração à circulação sistêmica. Ao contrário do que muitos pensam, a VA não executa sua função sozinha: todos os componentes da raiz aórtica trabalham em conjunto para manter o fluxo unidirecional e com a maior eficiência hemodinâmica possível (26).

Figura 4. Desenho esquemático da raiz aórtica e seus componentes.

Fonte: (26), adaptado.

¹ Como a VA é a mais comumente lesionada e substituída, e também devido ao fato dela ser considerada o paradigma da estrutura e da dinâmica tecidual das valvas, somente ela será descrita em detalhes.

² A Comissão de Terminologia da Sociedade Brasileira de Anatomia (SBA) vem há muito tempo tentando mudar o termo "cúspide" (que significa extremidade aguda) por outro mais correto, porém sabe-se que ele ainda é muito difundido e utilizado. A decisão adotada por esta Comissão foi denominar as subdivisões da valva como "válvulas" ou "folhetos". No entanto, considerando que: 1) o presente trabalho é altamente interdisciplinar, e 2) no vocabulário cotidiano, o termo "válvula" é utilizado para denominar a unidade anatomofuncional da valva, optou-se por utilizar apenas o termo "folheto" no decorrer no texto para evitar eventuais mal-entendidos (130).

Outro conceito ultrapassado, porém, comumente difundido, é que os folhetos da VA são estruturas meramente passivas. Pelo contrário, eles realizam funções complexas e sofisticadas, e seu formato, composição e estrutura evoluíram por milhões de anos para garantir o controle ótimo do fluxo sanguíneo. Essa arquitetura única é o resultado da constante interação das VC com o meio em que se encontram, sendo os esforços mecânicos aos quais estão submetidas e as reações a substâncias presentes na circulação sanguínea os principais fatores que determinam seu comportamento (27,28).

A VA abre durante a sístole, permitindo a passagem do sangue, e fecha na diástole, com um auxílio de um pequeno refluxo sanguíneo. Dessa forma, ela sofre três tipos diferentes de solicitação: 1) flexão, durante a abertura e fechamento dos folhetos; 2) cisalhamento, enquanto o fluxo sanguíneo passa através delas, e 3) tração, quando elas impedem o sangue de retornar (4). Apesar destas forças atuarem macroscopicamente, elas geram reações biomecânicas muito específicas a nível tecidual, e, por consequência, induzem uma resposta a nível celular também, alterando a expressão de proteínas e a produção de MEC (29).

Todas as VC possuem um padrão parecido de arquitetura estratificada, porém a VA é a que melhor exemplifica essa estruturação, sendo considerada como paradigma. Ela possui três camadas diferentes: *fibrosa*, *spongiosa* e *ventricularis* (Figura 5), cada uma com composição de MEC e função diferentes (30). Elas são detalhadas no Quadro 1, juntamente com a descrição dos principais tipos de célula que compõem a VA.

Figura 5. Desenho esquemático das estratificações dos folhetos valvares e corte histológico de um folheto nativo de VA.

Fonte: (29,31), adaptada.

Quadro 1. Principais componentes dos folhetos da VA, com suas respectivas localizações e funções que exercem para o funcionamento das valvas.

Componente principais	Localização	Função principal
Colágeno	Concentrado na camada <i>fibrosa</i>	Fornecem resistência e rigidez para manter a coaptação (junção dos folhetos) durante a diástole
Glicosaminoglicanas (GAG) e proteoglicanos	Concentrados na camada <i>spongiosa</i>	Reduzem o cisalhamento do movimento relativo das camadas e absorvem impacto
Elastina	Concentrada na camada <i>ventricularis</i>	Estendem durante a diástole e contraem durante a sístole, para minimizar área do folheto
Células endoteliais	Alinhadas nas camadas que ficam em contato com o sangue (<i>fibrosa</i> e <i>ventricularis</i>)	Promovem resistência a trombos, regulam reações inflamatórias e imunológicas
Células intersticiais	Entre as camadas de células endoteliais, formando um espectro quase contínuo de subfenótipos	Sintetizam e remodelam todos os elementos da MEC.

Fonte: (25,29,30)

A quantidade, qualidade e arquitetura desses componentes são os principais fatores que determinam não só o funcionamento da VA, mas também a sua durabilidade. E esse é o grande segredo para o sucesso das VC: elas interagem ativamente com o corpo e são capazes de crescer, se adaptar, e se renovar constantemente. Por este motivo, a ETVC é considerada a solução mais interessante a ser seguida, mesmo sendo algo tão complexo (1,27,30).

3.2. Doenças valvares

Segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), as DCV foram responsáveis por 31,3% das mortes registradas mundialmente no ano de 2015, liderando o

ranking das causas de morte. A doença arterial coronariana e o acidente vascular cerebral são os que mais matam, representando quase 80% das mortes por DCV (32).

Apesar das DV apresentarem uma baixa prevalência quando comparada a estas doenças, a necessidade de longos acompanhamentos e os altos custos referentes ao diagnóstico e tratamento das valvopatias tornam seu impacto nos sistemas de saúde muito relevante (6).

Além disso, a mudança na epidemiologia das DV ocorrida nas últimas décadas vem causando grande alerta nos países desenvolvidos (5). Atualmente, nas nações desenvolvidas, a principal preocupação é a CVA, sendo a estenose aórtica (EAo) a lesão mais comum resultante desta condição (33). Apesar de alguns estudos sugerirem que a regurgitação mitral é a valvopatia mais prevalente, a EAo é mais importante em termos de impacto clínico e a com maior mortalidade associada (6,34).

A CVA é uma doença considerada degenerativa, e sua forte associação com a idade combinada ao envelhecimento da população mundial fez com que ela fosse classificada por muitos como "a próxima epidemia cardíaca" (5,6). A proporção de cirurgias valvares aumentou na última década e, atualmente, esse tipo de procedimento já representa mais de 20% de todas as cirurgias cardíacas – espera-se, ainda, que este número triplique até 2050 (1,34). E os prejuízos aos sistemas de saúde não se resumem a isto: a CVA tende a se agravar ao longo do tempo, e, conforme sua severidade aumenta, outras alterações cardíacas começam a se manifestar. Em pacientes com EAo severa, sintomas de angina, síncope, dispneia e ataque cardíaco costumam se desenvolver em um período de três a cinco anos (13).

No entanto, ao contrário de outras doenças do tipo, como a aterosclerose, as valvopatias não afetam apenas os idosos, mas atingem a população pediátrica e jovem também (1). Nos países em desenvolvimento, a maior parte da morbidade e mortalidade atribuída a DV está relacionada à FR, consequência da infecção por *Streptococcus pyogenes* que ocorre principalmente em crianças (principalmente de 5 a 14 anos). Nesta doença, uma resposta imunológica provoca a inflamação crônica e a fibrose das valvas, resultando, posteriormente, no desenvolvimento de valvopatias enquanto estes pacientes ainda são jovens (6,34).

Em 2016, a FR foi responsável por 1,6% das mortes por DCV (35). Isso representa um fardo social muito grande para países pobres, pois é uma das principais causas de morte prematura e gera altas despesas para esses frágeis sistemas de saúde. Apesar de estatísticas mostrarem que a incidência da FR se manteve estável ou diminuiu nas últimas décadas, estudos mostram que a

prevalência desta doença é, provavelmente, altamente subestimada (em até 10 vezes) devido aos métodos diagnósticos utilizados (6,36). Um estudo realizado com os dados do Sistema Único de Saúde (SUS) durante os anos de 2001 e 2007 apontou que a FR ainda era a principal causa de lesões valvares no Brasil. Além disso, este estudo mostrou que mais de 70% dos pacientes do SUS que são submetidos à substituição ou ao reparo de valva tinham menos de 60 anos (37).

Outra doença que pode afetar a VA e atingir diferentes grupos etários é a endocardite infecciosa (EI), infecção do endocárdio causada por bactérias presentes na corrente sanguínea (1). Apesar da EI ser menos comum que a CVA e a FR (foi responsável por menos de 2% das mortes por DCV em 2016), sua mortalidade associada (>20%) e a necessidade de intervenção cirúrgica a mantém como uma forma importante de DV (6,35). Ela pode ser adquirida durante tratamentos hospitalares e através da implantação de dispositivos eletrônicos cardíacos, ocorrências estas que se tornam cada vez mais frequentes. Consequentemente, estima-se que a prevalência da EI também possa aumentar nos próximos anos (6).

Outra importante causa de valvopatias em jovens é a valva aórtica bicúspide (VAB), que, ao contrário das doenças mencionadas anteriormente, não é adquirida e sim congênita. A VAB é caracterizada pela fusão dos folhetos aórticos durante a vavulogênese, e é a malformação congênita cardíaca mais comum, tendo prevalência estimada de 1 a 2%. Sua patologia ainda não foi completamente elucidada, porém acredita-se que há um componente genético associado (38).

As configurações anatômicas da VAB podem variar, porém todas elas causam alteração na hemodinâmica e na distribuição de tensões que eventualmente levam a uma deterioração precoce da valva (1). Apesar de algumas crianças apresentarem casos clínicos graves devido à VAB, a maioria dos pacientes (75%) passa a ser sintomático e necessita de uma prótese apenas quando adultos, na faixa dos 40 a 50 anos de idade (6,38).

Além destas doenças, outras causas de valvopatias incluem doenças genéticas, como a síndrome de Marfan, de Williams, de Noonan e de Holt-Oran que podem afetar o desenvolvimento das VC, porém elas são menos comuns (1).

A tendência é que o número de jovens que necessitam de substituição valvar e adultos que necessitam de reoperações aumente nos próximos anos, devido à maior taxa de sobrevivência

de pacientes com malformações congênitas (graças ao avanço das técnicas cirúrgicas pediátricas) e também ao aumento da expectativa de vida da população em geral (6).

3.3. Histórico e quadro atual das próteses valvares

Antes do advento das próteses valvares, a única alternativa existente para o tratamento das DV era a valvuloplastia, que podia ser realizada na forma de comissurotomia ou de uma dilatação com os dedos. Ambas as técnicas tiveram seu início registrado durante a década de 20, e, apesar de ainda um pouco rudimentares e de caráter paliativo, representaram um grande avanço na medicina (39).

O primeiro modelo de prótese valvar a surgir foi a prótese de bola e gaiola, cuja inspiração é comumente atribuída a uma patente de uma rolha, produzida em 1858. Hufnagel e Campbell (paralelamente) foram os primeiros a elaborar a ideia, no começo da década de 1950, porém logo em sequência outros pesquisadores começaram a desenvolver projetos similares. Depois de muitas tentativas, e, graças também aos avanços em várias outras áreas – como nas técnicas e equipamentos cirúrgicos, na engenharia de materiais e nos conhecimentos de biologia e farmacologia – ocorreu, em 1960, o primeiro implante bem sucedido de uma prótese valvar (39).

Tratava-se da prótese desenvolvida pelo Dr. Albert Starr e o engenheiro Lowell Edwards, composta por uma bola de silicone presa à uma gaiola de poli(metil metacrilato) (PMMA), com um anel na base. Algumas modificações foram realizadas ao longo dos anos – como a troca do PMMA por uma liga de cromo-cobalto e a utilização de sulfato de bário para tornar a bola radiopaca – porém o modelo 6120 foi amplamente utilizado, praticamente inalterado, por mais de 20 anos. Estima-se que mais de 175 mil pacientes receberam uma prótese Starr-Edwards (contando posições mitral, aórtica e tricúspide), e existem relatos na literatura de pacientes que permaneceram mais de 35 anos com essa prótese (39,40).

Entretanto, essa prótese apresentava alguns problemas, como os altos gradientes transvalvares, o pequeno orifício efetivo, alto perfil e a falta de fluxo central, o que impulsionou o desenvolvimento de novos modelos de prótese nas décadas seguintes e, atualmente, ela é considerada obsoleta e não é mais implantada (40). Outros modelos surgiram desde então, como a prótese de disco basculante, porém devido à alta incidência de falhas repentinas das próteses Bjök-Shiley, elas foram rapidamente retiradas do mercado. Atualmente, as próteses mecânicas são majoritariamente próteses de duplo folheto, que são compostas por dois semi discos de carbono pirolítico presos a um anel envolvido por um bordelete de tecido de poliéster (15,41).

As próteses valvares mecânicas foram avançando de forma incremental ao longo dos anos, atingindo níveis altamente satisfatórios de durabilidade, boa hemodinâmica e facilidade de implantação. A maior desvantagem delas, no entanto, é que elas causam alterações no fluxo fisiológico que podem acarretar problemas circulatórios (15). Por este motivo, todos os pacientes com estas próteses mecânicas devem ser submetidos a um tratamento vitalício com anticoagulantes, o que pode levar a episódios hemorrágicos e diminuir significativamente sua qualidade de vida (42–44).

Nas últimas décadas, observou-se um declínio no uso deste tipo de prótese devido à crescente popularidade das próteses biológicas; no entanto, devido à alta durabilidade das próteses mecânicas, elas muito provavelmente continuarão a ser utilizadas por muito tempo (15,45).

As próteses biológicas são aquelas que imitam a anatomia nativa das valvas semilunares, possuindo assim três folhetos. Elas podem ser porcinas ou de tecido de pericárdio bovino, ambos reticulados com glutaraldeído. Por utilizarem materiais mais flexíveis, apresentam uma melhor hemodinâmica e minimizam a ativação plaquetária, a hemólise e a formação de trombos, eliminando a necessidade de anticoagulantes. No entanto, a grande desvantagem deste tipo de prótese é que sua falha estrutural é inevitável a longo prazo. As principais causas de falha são a degeneração e a calcificação dos folhetos, porém também existem outros fatores como a formação de *pannus* (tecido de origem inflamatória) e a trombose (15,17,46).

Apesar das melhoras no *design*, nos métodos de reticulação e nos agentes anticalcificantes, a durabilidade das próteses biológicas ainda é muito inferior à das mecânicas. Evidentemente, isto varia de acordo com a idade, as comorbidades e os hábitos do paciente, porém reoperações são comuns após 15 anos de uso, e esse segundo procedimento cirúrgico vem acompanhado de índices de mortalidade relativamente altos (de 5 a 15%, dependendo da posição do implante) (15,17).

Outra alternativa comumente utilizada no tratamento de DV é a utilização de homoenxertos criopreservados (HC) (valvas cadavéricas humanas usadas para transplante). Elas vêm sendo utilizadas com sucesso há mais de 50 anos, por terem desempenho hidrodinâmico próximo ao fisiológico, por estarem relacionadas à maior regressão da hipertrofia muscular quando comparados às próteses mecânicas ou biológicas, por apresentarem índices quase nulos de tromboembolismo e possuírem maior resistência à infecção. No entanto, a oferta dessas estruturas não é compatível com a demanda, elas apresentam durabilidade limitada, a técnica

de implantação mais complexa e existe a possibilidade de falha causada por uma resposta imunológica, especialmente em crianças (44,47).

Um grande avanço no tratamento de pacientes de alto risco (alguns antes inoperáveis) e nas reoperações valvares, veio com o surgimento TAVR (Figura 6), implantadas pela primeira vez em humanos no ano de 2002. Elas consistem em folhetos de pericárdio bovino presos em um *stent* (nesse caso, o *stent* é uma malha metálica similar aos dispositivos endovasculares, porém com diâmetro maior e mais robustos), que podem ser crimpados e implantados de forma minimamente invasiva através de um cateter, normalmente inserido via artéria femoral (15,17).

Figura 6. Exemplos atuais de TAVR.

Fonte: (15).

As complicações mais frequentes associadas a este tipo de prótese incluem vazamento paravalvar e lesão vascular, porém como se trata de um dispositivo relativamente recente, alguns outros problemas ainda estão sendo descobertos (43). Também devido à sua história recente, ainda não se sabe exatamente qual a sua durabilidade, visto que a experiência com próteses biológicas convencionais sugere que um período de acompanhamento mínimo de dez anos é necessário para avaliar esse quesito (48). Apesar disso, e também do custo superior que o das demais, as TAV vêm sendo muito utilizadas, não só para os casos mais graves, mas também para grupos de risco intermediário (15,49,50).

Outro tipo recente de prótese e que vem sendo indicada como alternativa para os pacientes da chamada “zona cinza” (recomendação intermediária entre as próteses cirúrgicas convencionais e a TAVR) são as próteses de liberação rápida/sem sutura (Figura 7). Elas são próteses biológicas, normalmente de tecido de pericárdio bovino, que são ancoradas no anel aórtico utilizando três suturas ou menos. Devido a este procedimento de fixação mais rápido, o tempo de cirurgia é reduzido, o que implica em menos trauma cirúrgico para o paciente e também um menor custo da operação (51,52).

Figura 7. Exemplos atuais de próteses de liberação rápida/sem suturas.

Fonte: (51).

No âmbito da pesquisa, um tipo de prótese valvar que vem chamando bastante atenção são as próteses poliméricas, principalmente de poliuretano (PU). Outros polímeros, como o silicone e o politetrafluoretileno (PTFE) também já foram considerados como candidatos, porém o PU se destaca pela resistência à tração e à fadiga e por sua hemocompatibilidade. No entanto, ainda restam desafios a serem resolvidos, principalmente os referentes à biodegradação e à mineralização dos folhetos (46).

As vantagens e desvantagens das alternativas atuais, comercialmente disponíveis, estão resumidas no Quadro 2.

Quadro 2. Resumo das principais vantagens e desvantagens dos substitutos valvares atuais.

Tecnologia	Vantagens	Desvantagens
Próteses mecânicas	• Durabilidade	• Fluxo central reduzido • Tratamento com anticoagulantes: risco hemorrágico
Próteses biológicas	• Não necessita de anticoagulantes	• Menor durabilidade: degradação, calcificação (que podem ser acelerados) • Formação de pannus • Risco de zoonoses
Homoenxertos	• Desempenho hidrodinâmico próximo ao fisiológico	• Baixa disponibilidade • Durabilidade limitada • Possibilidade de falha por uma resposta imunológica
TAVR	• Implantação minimamente invasiva	• Custo elevado • Tecnologia mais recente, não há resultados a longo prazo
Próteses de liberação rápida/sem sutura	• Menor tempo de cirurgia (comparado às próteses cirúrgicas convencionais)	• Tecnologia mais recente, não há resultados a longo prazo

Fonte: (15,43,44,52)

A principal desvantagem delas, no entanto, é que nenhuma é capaz de remodelar, problema especialmente crítico para os pacientes pediátricos. Estes pacientes, além de sofrerem com as desvantagens inerentes de cada tipo de prótese/técnica, possuem tratos muito pequenos, que

podem chegar a dobrar ou triplicar de tamanho ao longo de seu crescimento, e necessitam de uma estrutura que consigam acompanhar essa mudança (1).

Outras técnicas, como a valvuloplastia e o procedimento de Ross (que consiste na utilização de um homoenxerto pulmonar no lugar da VA lesionada e na implantação de uma prótese/homoenxerto na posição pulmonar, de menor solicitação mecânica), são alternativas utilizadas para algumas crianças. No entanto, a valvuloplastia é mais comum e eficaz para deformidades da VM, e essas soluções não são necessariamente definitivas, apenas postergando o aparecimento dos mesmos problemas (1,43,53). Algumas TAVR também vêm sendo testadas para sanar o problema da expansão do trato, porém continuam se tratando de próteses biológicas, tendo assim uma durabilidade limitada (54,55).

Novamente, a importância da construção de estruturas vivas, construídas através da ET, é ressaltada. Além de não apresentarem as desvantagens dos substitutos atuais, elas seriam capazes de solucionar de fato o grande problema vivenciado por estes pacientes pediátricos.

3.4. Engenharia Tecidual e a Engenharia Tecidual de Valvas Cardíacas

A ET é comumente definida como o “campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual” (19). Para isso, ela se utiliza de três principais componentes, frequentemente chamados de tríade da engenharia tecidual: células, arcabouços tridimensionais (também chamados de *scaffold*, o termo em inglês) e sinais/estímulos. Os arcabouços atuam como um suporte para a formação tecidual, e, ocasionalmente, são estimulados de forma química, mecânica ou até mesmo elétrica. (20).

Estes componentes podem ser utilizados e combinados de diferentes formas, sendo que existem duas abordagens principais na ET: 1) a *in vitro*, que consiste em coletar células do próprio paciente, semeá-las em um arcabouço e promover o crescimento do tecido *in vitro* (onde o processo pode ser monitorado e controlado minuciosamente); e 2) a *in situ*, que contorna a fase *in vitro* e utiliza o próprio corpo do paciente para promover o crescimento tecidual. Apesar da abordagem *in situ* ser considerada mais viável clinicamente, devido à disponibilidade imediata para implantação, ela também é considerada muito mais complexa, pois controlar a migração e diferenciação celulares dentro do corpo não é uma tarefa trivial (56,57).

Em ambos os casos, os arcabouços utilizados devem atender a uma série de especificações – evidentemente, elas variam de forma considerável com a aplicação desejada, mas alguns

requisitos gerais podem ser apontados. Tais arcabouços devem: 1) ser citocompatíveis, ou seja, devem permitir adesão, migração, proliferação e funcionamento normais das células; 2) ser biodegradáveis, devendo desaparecer à medida que o tecido cresce; 3) possuir propriedades mecânicas adequadas, que variam de acordo com o tecido alvo, porém permitindo minimamente o manuseio e a implantação cirúrgica; 4) apresentar uma microestrutura adequada, normalmente porosa, para permitir a penetração celular e a difusão de nutrientes; 5) ter uma produção viável, tanto em termos de reprodutibilidade, escalabilidade e custo, para se tornarem comercialmente viáveis (20).

Para tecidos moles, a grande maioria dos arcabouços utilizados é polimérica (20). Simplificadamente, eles podem ser classificados em três tipos principais, categorizados de acordo com a origem do material utilizado em suas fabricações:

- Arcabouços descelularizados: consistem em tecidos alogênicos ou xenogênicos que tem as células removidas por métodos enzimáticos ou com detergentes. O processo de descelularização deve remover todas as células para evitar qualquer resposta imunológica, porém, ao mesmo tempo, deve preservar os componentes da MEC para que o arcabouço suporte devidamente o crescimento celular (58);
- Polímeros sintéticos: o uso destes polímeros na área médica é relativamente nova, com as pesquisas na área começando na década de 1960, sendo o poli(ácido glicólico) (PGA) um dos primeiros a ser investigado para esta finalidade. As famílias mais estudadas são as derivadas do ácido láctico e do ácido glicólico, os polihidroxialcanoatos e a poli(caprolactona), porém uma vasta gama de outros polímeros vem sendo estudada. O principal mecanismo de degradação destes materiais é a degradação hidrolítica (59);
- Polímeros naturais: o uso destes materiais para fins medicinais já data de milhares de anos. São proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, podendo ser de origem humana (como o colágeno, elastina e ácido hialurônico), ou não-humana (como a quitosana e o alginato). A degradação destes polímeros é majoritariamente enzimática (59).

Suas principais vantagens e desvantagens encontram-se listadas no Quadro 3.

Quadro 3. Resumo das vantagens e desvantagens dos principais tipos de arcabouço utilizados na ET.

Material	Vantagens	Desvantagens
Tecidos descelularizados	• Excelente compatibilidade imunológica quando autólogo/allogênico • Presença de biomoléculas importantes • Estrutura análoga ao tecido	• A descelularização incompleta pode causar reações imunológicas • Propriedades muito variadas – dependentes da fonte e do protocolo de descelularização
Polímeros sintéticos	• Menor risco de trombogênese • Facilmente obtidos em larga escala • Várias técnicas de fabricação podem ser aplicadas • Maior controle das propriedades	• Não fornecem informações biológicas, portanto adesão celular pode ser dificultada • Produtos da degradação podem causar reações indesejadas, como inflamações
Polímeros naturais	• Compatibilidade imunológica excelente quando autólogo/allogênico • Presença de biomoléculas importantes	• Baixa resistência mecânica • Propriedades variadas – dependentes da origem e método de obtenção • Quando xenogênicos podem provocar reações imunológicas • Potencial para calcificação

Fonte: (20,60–63).

Desde a década de 1990, vários produtos da ET foram disponibilizados para comercialização no mercado médico, principalmente como substitutos/tratamentos de pele,

ossos e cartilagem (23). No caso das VC, no entanto, essas alternativas ainda não estão disponíveis, principalmente por se tratarem de estruturas de geometria e composição mais complexas, que devem atender a requisitos mecânicos mais severos (24,25).

Nas próximas subseções, serão descritos os principais trabalhos referentes aos diferentes tipos de arcabouço utilizados na ETVC.

3.4.1. Arcabouços descelularizados

Tendo em vista essa complexidade microestrutural das VC, muitos acreditam que as VC descelularizadas sejam o melhor tipo de arcabouço para a ETVC. De fato, o primeiro produto para ETVC liberado para uso clínico foi a valva porcina descelularizada Synergraft (Cryolife Inc., EUA), modelos 500 e 700, implantadas em quatro crianças em 2011. Apesar dos resultados satisfatórios em testes com animais, a implantação em crianças foi catastrófica, resultando na morte de três desses pacientes devido a fortes reações inflamatórias (64,65). Após esse triste episódio, a Cryolife passou a comercializar a Synergraft como uma tecnologia de descelularização, que passou a ser aplicada em homoenxertos para tentar amenizar a reposta imunológica do receptor (66,67).

Na literatura, estudos com este e com outros protocolos de descelularização são encontrados, e os resultados são bastante diversos. Em alguns estudos, o uso de homoenxertos descelularizados mostrou uma taxa de reoperação reduzida comparada aos HC (68). No entanto, outros estudos mostram que não há diferenças significativas entre os dois, além da recelularização dos arcabouços não ser completamente satisfatória (66,67). Algumas modificações nos protocolos utilizados, como o recobrimento dos arcabouços com biomoléculas, ou a semeadura de células pré-implantação, são alguns dos enfoques pesquisas mais recentes e vêm trazendo resultados promissores (69,70).

Atualmente, existem alguns homoenxertos descelularizados em fase de avaliação clínica, como o Espoir PV® e o Arise AV® da Corlife. No entanto, a utilização de HC volta a cair na questão da disponibilidade destes componentes e ressalta a necessidade de outros tipos de arcabouço. Além disso, muitos estudos ainda mostram a preocupação com o uso deste tipo de material em pacientes pediátricos (71).

3.4.2. Polímeros sintéticos

Os primeiros a demonstrar a viabilidade do uso de polímeros sintéticos biorreabsorvíveis para a ETVC foram Shinoka e colegas, na década de 90. Seus estudos foram

iniciados com o PGA e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) utilizando um único folheto como alvo, e estes materiais acabaram sendo descartados para a aplicação devido ao espessamento, endurecimento e falta de flexibilidade dos tecidos formados (72–74). Deste momento em diante, a partir da síntese de novos biomateriais e do desenvolvimento de novas técnicas de fabricação, vários grupos foram desenvolvendo novas metodologias.

Durante muitos anos, Hoerstrup e colegas investiram em um arcabouço de PGA recoberto com poli(4-hidroxibutirato) (P4HB). Diferentes fontes celulares, biorreatores e métodos de implantação foram testados tanto para a posição pulmonar quanto para a aórtica (44,75–82). No entanto, após anos de pesquisa, o grupo divulgou trabalhos nos quais afirma que estes materiais podem não ser completamente adequados para a ETVC, devido à sua degradação rápida e pouco controlável, e passou a explorar também outras possibilidades, como polímeros como a poli(ε-caprolactona) (PCL) (44,83,84).

Uma forte tendência no momento, dado que a microestrutura dos folhetos é em grande parte fibrosa, é a utilização arcabouços fibrosos para a ETVC, principalmente fabricados por eletrofiação [e com vários polímeros diferentes, como PU e poli(glicerol sebacato) (PGS)] (85–88). Na eletrofiação, as fibras são geradas através de um jato carregado eletricamente (composto pela solução polimérica), que é continuamente esticado devido a interações eletrostáticas entre as cargas da superfície e o solvente que evapora. Para isso, ela utiliza três principais componentes: uma fonte de alta tensão, uma agulha metálica e um coletor metálico aterrado (89).

Apesar de outras técnicas similares, como a rotofiação e a fiação por sopro em solução (FSS, também conhecida como *airbrushing*), serem menos utilizadas, elas vêm chamando atenção em várias áreas, incluindo a ETVC (90). A FSS é particularmente interessante pois produz microestruturas semelhantes às da eletrofiação, porém utilizam gás/ar comprimido para extrudar fibras a partir de soluções poliméricas, sendo assim mais segura e menos custosa. Outras vantagens incluem a utilização de coletores não metálicos, possibilidade de recobrir moldes e alta taxa de deposição (91).

Para uma listagem mais completa e detalhada dos trabalhos da literatura sobre arcabouços fibrosos para a ETVC, recomenda-se verificar o artigo de revisão “A review on fibrous scaffolds in cardiovascular tissue engineering” (92).

3.4.3. Polímeros naturais

Os polímeros naturais são muito utilizados na ET de forma geral, porém para aplicações onde a resistência mecânica é essencial, como é o caso da ETVC, seus usos ainda são limitados

e eles são normalmente utilizados em conjunto com polímeros sintéticos (25,93,94). Alguns grupos como o de Tranquillo e Vesely tentaram empregar puramente colágeno e outros componentes da MEC valvar na construção de arcabouços para a ETVC, porém os resultados não foram considerados satisfatórios (95–97).

3.4.4. Arcabouços híbridos

A combinação de diferentes tipos de materiais também é comum na ETVC, pois normalmente os polímeros naturais e sintéticos possuem características complementares. Capulli e colaboradores, por exemplo fabricaram estruturas denominadas “JetValves” (por serem fabricadas através da técnica de “jet spinning”) com P4HB e gelatina. Essa combinação resultou em propriedades estruturais, mecânicas e bioquímicas semelhantes à camada *fibrosa* das VC nativas, e os folhetos parecem ser duráveis e funcionais de acordo com as avaliações *in vitro* e *in vivo* realizados pelos autores (98).

Hong *et al* e Jahnavi *et al* utilizaram polímeros naturais e sintéticos para recobrir arcabouços porcinos/bovinos descelularizadas, o que resultou em melhores propriedades mecânicas e no aumento da hidrofiliabilidade da estrutura, o que deve beneficiar a interação célula-substrato (99–101).

Além destas estratégias, nos últimos anos, alguns grupos de pesquisa vêm investindo em uma outra espécie de técnica híbrida, que consiste em utilizar primeiramente uma matriz produzida artificialmente (seja com polímeros naturais ou sintéticos), semeá-la, cultivá-la *in vitro* e então descelularizá-la para o implante, o que resultaria em disponibilidade imediata e abundante destes arcabouços (102–104).

3.4.5. Estado da arte e desafios atuais

Um dos maiores projetos relacionados à ETVC no momento é o ImaValve (sigla para *intelligent materials for in-situ heart valve tissue engineering*), um consórcio europeu com parceiros acadêmicos e industriais situados na Holanda, Suíça e Alemanha, e coordenado pela Prof.^a Carlijn Bouten, da *Technische Universiteit Eindhoven*. Este projeto vem sendo desenvolvido há anos e já foram estudados diversos materiais e técnicas de fabricação diferentes para a produção de um arcabouço para ETVC *in situ*.

Este projeto contou, só entre 2014 e 2017, com um orçamento mais de 7 milhões de euros. Segundo o relatório publicado no final de 2017 (disponível em <https://cordis.europa.eu/project/rcn/110963/reporting/en>), estes pesquisadores conseguiram

desenvolver um arcabouço valvar sintético, de disponibilidade imediata (pronta para uso), que pode ser implantado de forma minimamente invasiva e na qual ocorre a formação de neotecido (105). Apesar dos vários materiais e técnicas de fabricação testados por este grupo, os arcabouços aos quais eles se referem nesse relatório, e que até o momento apresentaram os resultados mais promissores, são os fabricados com um elastômero supramolecular, o policarbonato bis-ureia-modificado (PC-BU), eletrofiado (106,107).

Testes realizados em ovelhas durante um período de 12 meses na (posição pulmonar) apontaram altos níveis de celularização e formação de tecido (Figura 8). A coaptação dos folhetos se manteve satisfatória, apesar de ter piorado no decorrer do tempo. Apesar de mencionarem que este arcabouço também é compatível com implantação minimamente invasiva, até o momento não foram publicados resultados a respeito deste assunto. Atualmente, estes arcabouços já se encontram em fase de testes clínicos como substitutos de VP (106,107).

Figura 8. Aspectos macroscópicos (A) do arcabouço de PC-BU eletrofiado e (B) do explante após 12 meses de implantação (posição pulmonar, em ovelhas).

Fonte: (106).

Alguns dos arcabouços desenvolvidos por este grupo (de PGA recobertos com P4HB) foram testados na posição aórtica, porém as publicações referentes a estes experimentos são mais focadas na comprovação da incorporação dos folhetos no *stent* metálico e na metodologia empregada na cirurgia minimamente invasiva. Portanto, são avaliados quesitos como o tempo gasto na coleta e semeadura de células, a liberação do implante, avaliação do posicionamento e seu desempenho a curto prazo (até 2 semanas), não havendo resultados para períodos de implantação mais longos (80,81,105,108). Paradoxalmente, em publicações anteriores do grupo, o uso destes polímeros foi questionado devido à rápida degradação que sofrem *in vivo* (84).

Apesar dos resultados promissores, é importante ressaltar que eles foram obtidos apenas para modelos animais, e em animais saudáveis. Os testes clínicos ainda precisarão elucidar como a migração celular, a implantação e a integração deste arcabouço se darão em humanos, especialmente quando houver alguma patologia envolvida (como a diabetes ou a calcificação do anel aórtico, por exemplo) (71).

Além disso, um grande desafio continua sendo a manutenção da coaptação dos folhetos a longo prazo, pois há uma forte tendência à retração dos mesmos com o decorrer do tempo, ainda que pequena. As soluções que vêm sendo cogitadas para resolver esse problema são várias, e incluem a modificação no *design* do arcabouço, a incorporação de outras características anatômicas como seios de Valsalva, a utilização de polímeros com degradação lenta (como o PCL e o PC-BU) e a mudança de certos protocolos de cultura celular (83,104,106).

A solução do problema provavelmente não está ligada a apenas um parâmetro, mas sim na combinação de todos mencionados acima, além de outros fatores como o pré-condicionamento adequado em biorreator (para a abordagem *in vitro*) e a incorporação de moléculas contendo informações biológicas. Espera-se que os avanços na área de biologia molecular, biomateriais e simulação computacional possam ajudar a elucidar os pontos-chave para o sucesso da ETVc.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma a seguir mostra todas as etapas realizadas no projeto.

Figura 9. Fluxograma que resume as principais etapas do projeto.

* mesmos materiais e técnicas utilizadas na fabricação do protótipo, porém em formato simplificado (p.ex. retangular)

Fonte: autoria própria.

O presente projeto teve início durante o Mestrado em Engenharia Biomédica realizado na Universidade Federal do ABC (UFABC), sob orientação da Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Malmonge (109). Por este motivo, parte da seleção de materiais, de técnicas e elaboração de protocolos de fabricação já haviam sido realizados e testados, sendo incorporados diretamente na metodologia do projeto de Doutorado.

A partir do protótipo elaborado durante o Mestrado, a simulação computacional foi utilizada para verificar como seria possível otimizar a distribuição de tensões no suporte estrutural do arcabouço (etapa denominada de “otimização”). A partir da resposta obtida nesta etapa, prosseguiu-se para a fabricação deste novo modelo, utilizando as técnicas de FSS e manufatura aditiva (MA). O protótipo foi então submetido a uma avaliação de desempenho hidrodinâmico em um simulador de ventrículo esquerdo.

Paralelamente, utilizando a mesma técnica de fabricação dos folhetos, foram elaboradas amostras em formato simplificado para as caracterizações químicas, mecânicas e morfológicas do material³. Por último, foi realizada uma avaliação biológica do material dos folhetos, em cultura estática e *in vitro*.

A esterilização plasma de peróxido de hidrogênio foi o primeiro a ser escolhido por ser um processo realizado a baixas temperaturas (podendo, portanto, ser utilizado em materiais termosensíveis) e que não deixa resíduos tóxicos (110,111). Ele foi primeiramente validado, utilizando o Método de Inoculação Direta e depois, para verificar se houve algum impacto negativo deste processo de esterilização nas amostras, elas foram novamente caracterizadas utilizando as mesmas técnicas.

4.1. Otimização do protótipo

O objetivo dessa etapa foi verificar se havia a possibilidade de melhorar o *design* do *stent* (a base estrutural do protótipo, desenvolvida no Mestrado) em termos de seu desempenho mecânico, o que envolve as tensões mecânicas de von Mises, a rigidez estrutural e o volume de material a ser utilizado. Tal objetivo pode ser alcançado utilizando técnicas de otimização estrutural, como, por exemplo, o método de otimização topológica (MOT), adotado neste trabalho.

O MOT é uma técnica que combina o método de elementos finitos (MEF) com algoritmos de otimização (112). O MEF é um método numérico utilizado para obter soluções aproximadas de equações diferenciais e, para isso o domínio de um problema é subdividido em partes menores, que são chamadas de elementos finitos (EF) (113). Essas equações diferenciais estão relacionadas à modelagem do problema que se deseja resolver, que pode ser, por exemplo, de origem elétrica, magnética, térmica, mecânica, ou mesmo um acoplamento de dois ou mais casos. Nesse trabalho, o que se pretende analisar é um efeito mecânico, como as tensões e rigidez mecânicas.

Para poder aplicar o MOT, primeiro é necessário desenhar a peça que se deseja otimizar em um *software* de CAD (do inglês, *Computer Aided Design*) – no caso, foi utilizado o *software*

---

³ O material definitivo do *stent* ainda não foi testado, pois o processo de fabricação de filamentos para MA ainda não demonstrou resultados satisfatórios. Os materiais testados na fabricação desta parte do protótipo são apenas provisórios, por não serem de grau médico, não havendo motivo para realizar uma caracterização completa deles neste momento.

Solidworks (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, França). A geometria pode ser vista na Figura 10.

Figura 10. Geometria do *stent* elaborada em *software* de CAD.

Fonte: autoria própria.

Em seguida, a geometria ilustrada na Figura 10 foi subdividida na forma de EF, como mostrado na Figura 11, e o elemento utilizado foi do tipo hexaédrico.

Figura 11. Modelo de elementos finitos do *stent*.

Fonte: autoria própria/Prof. Dr. Ronny Calixto Carbonari.

Após estes passos, iniciou-se o processo de otimização, cuja primeira etapa é definir as condições de contorno, que são dados necessários para que o MEF consiga solucionar as equações diferenciais e, conseqüentemente, obter os resultados das tensões e da rigidez mecânicas. De maneira simplificada, foram informadas quais são as regiões onde o *stent* tem movimento restrito e onde as forças são aplicadas (tanto direção quanto magnitude) (Figura 12).

Neste caso, as restrições de deslocamento foram aplicadas nos eixos x , y e z , e somente a um terço da geometria, por ela apresentar uma simetria cíclica (cujas regiões de simetria estão

indicadas pelos dois planos que interceptam a base na Figura 12). O carregamento foi aplicado na direção radial (como ilustra a seta na Figura 12) e com intensidade de 3N. Este valor de 3N é a força resultante quando uma pressão de 120 mmHg é aplicada na área interna da base (porém dividida por 3, devido à simetria).

Figura 12. Condições de contorno utilizadas no modelo de EF. Os planos indicam as regiões fixas e a seta, o local de aplicação e a direção da força aplicada (radial).

Fonte: autoria própria/Prof. Dr. Ronny Calixto Carbonari.

Com o modelo de EF preparado, definiu-se o objetivo da otimização, que foi maximizar a rigidez estrutural considerando uma restrição, que limitava a quantidade de material à 90% do volume inicialmente fornecido (ainda considerando apenas um terço do *stent*). Ou seja, o resultado MOT é um novo *design*, que utiliza menos material, porém apresenta um desempenho mecânico similar ao da peça mostrada na Figura 10.

Para verificar o efeito da retirada do material, realizou-se uma simulação computacional para comparar as tensões equivalentes de von Mises para o *stent* antes e depois da otimização. As condições de contorno utilizadas nesta simulação foram as mesmas utilizadas na otimização, para ambos os modelos.

4.2. Fabricação do protótipo

4.2.1. Suporte do protótipo (*stent*)

Devido ao formato complexo da peça, o método de fabricação escolhido foi o de MA, com a tecnologia de modelagem por deposição de material fundido (*FDM – Fused Deposition Modeling* em inglês). Foram testados dois polímeros: o PLA (MovTech, São Bernardo do Campo, Brasil) e a PCL Capa 6505 (Perstop, Malmö, Suécia).

No caso do PLA, adquirido na forma de filamento de 1,75 mm de diâmetro, a impressora 3D utilizada foi a MovTech P4 (MovTech, São Bernardo do Campo, Brasil), em conjunto com o *software* livre Cura 14.12.1 (Ultimaker, Geldermalsen, Holanda). Os parâmetros de impressão utilizados foram: temperatura do bico de 190 °C, temperatura da mesa de 60 °C, altura das camadas de 0,25 mm e velocidade de impressão de 70 mm/s. A deposição de material de suporte é calculada automaticamente pelo *software*, e a opção de suporte em todos os lugares foi selecionada. Depois de impressa, a peça foi retirada do suporte e foi lixada nos pontos onde havia contato com o mesmo, para um melhor acabamento.

Pelo fato da PCL estar na forma de pó, foi utilizada a impressora Fab@CTI (baseada no projeto Fab@Home) do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) (114). Ela possui um cabeçote modificado, com um moinho que mistura o pó e o alimenta para o bico, onde o material é fundido. Os parâmetros utilizados foram: temperatura do bico de 100 °C e altura das camadas de 0,4 mm. A mesa não possuía aquecimento e não era possível utilizar material de suporte.

Tanto o PLA como o PCL utilizados nestas etapas não possuem grau médico (e, portanto, não podem de fato ser implantados em seres humanos) e foram utilizados apenas para viabilizar a utilização das impressoras 3D disponíveis. Após os testes iniciais com estes polímeros, tentou-se adquirir filamentos de polímeros biorreabsorvíveis de grau médico, tanto através de grupos de pesquisa que trabalham com a síntese destes materiais, como através de empresas que comercializam este tipo de produto.

4.2.2. Folhetos

A técnica escolhida para a fabricação dos folhetos foi a de FSS. A FSS é uma técnica que utiliza um fluxo de gás ou ar comprimido para extrudar fibras a partir de uma solução polimérica. Ela é uma alternativa ao processo de eletrofiação, e possui vantagens como menor custo operacional, maior segurança (pois não utiliza altas tensões elétricas) e possibilidade do uso de coletores não metálicos (115).

Uma solução de 6% m/V de PCL (Mn 80.000 Sigma Aldrich, Missouri, EUA) em clorofórmio (Synth, Diadema, Brasil) foi despejada em um aerógrafo profissional (modelo AB116K, bico de 0.8 mm – Royalmax, China). O aerógrafo foi conectado a um compressor odontológico (modelo S-45 -Schuster, Santa Catarina, Brasil), ajustado a uma pressão de 30 psi.

Para que o formato dos folhetos ficasse correto e padronizado, as fibras foram depositadas sobre um molde acoplado a uma bomba de vácuo (Spencer Scientific, Santo André, Brasil), o que otimiza a deposição de fibras no formato côncavo.

O molde foi fabricado através de MA, porém utilizando a impressora 3D Objet 350 Connex3™ (Stratasys, Minnesota, EUA), que utiliza outra tecnologia de impressão 3D, diferente da FDM. Ela faz a deposição de microcamadas líquidas de polímero que são curadas, uma a uma, com luz ultravioleta (UV), e formam assim uma estrutura sólida. O material escolhido para esta aplicação foi o VeroWhitePlus (nome comercial), por ele ser rígido.

Antes do uso, o molde foi coberto com papel alumínio para evitar o ataque do solvente, facilitando também a retirada do molde no final do processo. Ao final da deposição, os três folhetos encontravam-se totalmente conectados no topo, não havendo separação alguma entre eles – por este motivo, com uma tesoura, foram feitos os cortes para delimitar cada um deles e possibilitar a abertura do dispositivo.

4.3. Caracterizações das amostras

As amostras foram fabricadas utilizando a mesma técnica descrita para a fabricação dos folhetos (seção 3.2.2), porém em formato simplificado (mantas fibrosas retangulares). A movimentação do aerógrafo também foi semelhante à utilizada na fabricação dos folhetos.

As caracterizações foram realizadas antes e depois do processo de esterilização⁴, para que fossem avaliados os possíveis efeitos do processo nas características das amostras.

4.3.1. Espectroscopia por infravermelho (FTIR)

Para a caracterização química das amostras, utilizou-se o espectrômetro Frontier (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) com o módulo de ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflexion*). Três amostras de PCL foram aleatoriamente recortadas de diferentes mantas e posicionadas sob a ponta do ATR. A varredura foi feita entre 450 e 4000 cm⁻¹ (número de onda), no modo de transmitância, e comparada com o espectro da matéria-prima, fornecido pelo fabricante.

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a caracterização da microestrutura dos materiais, foi escolhida a técnica de MEV. Pequenas amostras (aproximadamente 1 mm x 1mm) foram recortadas aleatoriamente das

---

⁴ Os ensaios realizados foram, na sua maioria, destrutivos; portanto, não foi possível caracterizar a mesma porção da amostra antes e depois da esterilização. Foram utilizadas amostras diferentes, porém que haviam sido confeccionadas na mesma batelada.

mantas fibrosas e coladas utilizando fita dupla face condutora nos porta-amostra metálicos. Elas foram então recobertas com uma camada de 10 nm de ouro, utilizando a evaporadora à vácuo Leica EM ACE200 (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemanha), no modo difuso. Para a obtenção das imagens, foi utilizado o microscópio FEI Quanta 250 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), no modo alto vácuo e com o detector de elétrons secundários. Detalhes sobre a voltagem e o aumento utilizados são mostrados nas micrografias.

4.3.3. Quantificação do alinhamento e diâmetro das fibras

Para verificar qual o grau de alinhamento das mantas fibrosas produzidas pela técnica de FSS, as imagens de MEV foram processadas utilizando o *software* ImageJ (*National Health Institute*, Maryland, EUA) e o *plug-in* Orientation J, desenvolvido e disponibilizado pelo *Biomedical Imaging Group*, da *École Polytechnique Fédérale de Lausanne* (disponível no site <http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/>).

Para uma rápida análise qualitativa, foi utilizada a função *Analysis*, e para uma análise quantitativa e mais aprofundada, foi utilizada a função *Distribution*, conforme referência encontrada na literatura (116). Ambas as funções realizam a análise de forma automatizada.

Para calcular o diâmetro das fibras, o *software* ImageJ também foi utilizado. A barra de aumento registrada em cada imagem foi utilizada para calibrar a função de medição. Foram escolhidas duas regiões diferentes, de forma aleatória, e em cada região foram medidos, manualmente, os diâmetros de 50 fibras.

4.3.4. Ensaaios de tração

Para avaliar as propriedades mecânicas sob tração das mantas produzidas pela técnica de FSS, foram realizados ensaios de tração no sistema de testes Tytron™ 250 equipado com o *software* TestWorks® (*MTS Systems Corporation*, Minnesota, USA), com uma célula de carga de 250 N, a uma velocidade de teste (ou seja, a taxa de separação das garras) de 5 mm/min.

Para verificar se o material poderia ser considerado isotrópico ou não, as amostras foram recortadas em duas direções diferentes, perpendiculares entre si. Foram utilizadas cinco amostras para cada direção.

Os dados foram registados e então processados utilizando os *softwares* Octave (*General Public License*) e Origin (OriginLab Corp., Massachusetts, EUA). As correções das curvas obtidas foram corrigidas seguindo a norma *ASTM D882-12 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*.

4.3.5. Ângulo de contato

Para avaliar a molhabilidade do material dos folhetos à água, três amostras de regiões aleatórias da manta fibrosa foram submetidas a um ensaio de ângulo de contato utilizando o tensiômetro CAM101 (KSV Instruments Ltd., Finlândia). O *software* Attentions Theta realizou os cálculos referentes ao ensaio, que foram registrados e posteriormente analisados com o *software* Origin (OriginLab Corp., Massachussets, EUA).

4.3.6. Desempenho Biológico

Esta etapa do projeto foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr., da Universidade Federal do ABC.

O meio de cultura 199 foi adquirido da Lonza Co. (Basel, Suécia), e o soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da empresa Nutricell Nutrientes Celulares (São Paulo, Brasil). O glutaraldeído e o tetróxido de ósmio (OsO_4) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA).

4.3.6.1. Cultura celular

As células utilizadas nesta etapa foram células Vero, uma linhagem fibroblásticas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. As células permaneceram em meio de cultura 199 suplementado com 10% de SFB com 5% CO_2 a 37°C. Este é um tipo celular bastante recomendado para estudos de citotoxicidade e interações célula-substrato em pesquisas na área de biomateriais (KIRKPATRICK, 1992; International Organization for Standardization, 2009).

4.3.6.2. Análises morfológica e citoquímica

Para os estudos morfológicos e citoquímicos, $1,0 \times 10^5$ células/ml foram cultivadas nas mantas fibrosas em meio 199 suplementado com 10% SFB. Após um período de 24 horas em cultura, amostras foram fixadas com Formalin 10% (em 0,2 M tampão fosfato, pH 7,2), lavadas em tampão fosfato e coradas com cristal violeta (CV) para análise morfológica; azul de toluidina (AT), pH 4,0, para a detecção de DNA, RNA e GAG; e xilidina ponceau (XP), pH 2,5, para identificação de proteínas catiônicas (118,119). As lâminas foram fotografadas com um microscópio Zeiss Axio Imager 2 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.4. Processo de esterilização e validação da esterilidade

4.4.1. Processo de esterilização

O primeiro método escolhido para teste foi o de plasma de peróxido de hidrogênio, pois é um método que pode ser utilizado para materiais termossensíveis, além de ser mais rápido e mais seguro que o óxido de etileno (pois não deixa resíduos tóxicos) (110,111). Antes de realizar o processo de esterilização, no entanto, foi necessário verificar qual metodologia seria utilizada para validar este processo.

A esterilização foi realizada na Central de Material e Esterilização (CME) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. As amostras a serem esterilizadas foram colocadas em embalagens Tyvek® (DuPont, Michigan, EUA) e esterilizadas no equipamento STERRAD® 100S (Advanced Sterilization Products/Johnson & Johnson, Nova Jérsei, EUA), utilizando o ciclo rápido (55 minutos), por não se tratar de dispositivo com lúmen ou dificuldade de penetração para o agente esterilizante. O protótipo completo também pôde ser esterilizado, seguindo o mesmo procedimento descrito.

4.4.2. Metodologia de validação da esterilidade

Como a norma ISO/NP 22441: *Sterilization of health care products -- Low temperature vaporized hydrogen peroxide -- Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices* ainda se encontrava em desenvolvimento, buscou-se na literatura um processo genérico, porém consolidado e bem descrito, para validação de esterilização de produtos médicos.

A partir desta busca, escolheu-se o Método de Inoculação Direta, cuja descrição detalhada pode encontrada na *Pharmacopeia* dos Estados Unidos (harmonizada com as *Pharmacopeias* europeia e japonesa) (120). Resumidamente, para validar a esterilização de uma peça, esta deve ser incubada em meio de cultura estéril que seja favorável ao crescimento de micro-organismos. Se, após um determinado período, o meio permanecer límpido, o processo pode ser validado. Caso contrário, caso o meio turve (o que indica crescimento de micro-organismos), o processo deve ser revisto.

Antes desta etapa, deve-se primeiramente comprovar que: (1) a esterilização do meio de cultura é eficaz; (2); não há contaminação, seja proveniente do ambiente ou manuseio incorreto de instrumentos; e (3) o meio utilizado encontra-se em bom estado e consegue promover o

crescimento de micro-organismos. A metodologia utilizada para comprovar todos estes critérios (chamada de Etapa 1) é descrito na Figura 13.

Figura 13. Fluxograma mostrando a primeira etapa do processo de validação da esterilização (validação dos meios de cultura e da esterilização dos mesmos).

Fonte: autoria própria.

Os meios fluido tioglicolato e caldo peptona de soja e caseína (KASVI, Paraná, Brasil) foram adquiridos prontos, na forma de pó, sendo pesados e misturados em água destilada na proporção indicada pelo fabricante. Ambos foram esterilizados em autoclave (Spencer Scientific, Santo André, Brasil) durante 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Os meios foram então vertidos em tubos tipo Falcon esterilizados, dentro de uma cabine de segurança biológica classe II-A1 (Trox Technik, São Paulo, Brasil) para que não houvesse contaminação externa.

Os micro-organismos utilizados para controle positivo (gentilmente cedidos pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo [IPT]) e seus respectivos meios de cultura são descritos no Quadro 4.

Quadro 4. Dados referentes aos micro-organismos utilizados para validar o processo de esterilização.

Micro-organismo	Cepa	Meio de cultura	Temperatura de incubação (°C)
Bactéria anaeróbia			
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404	Meio fluido tioglicolato	20 a 25
Bactéria aeróbia			
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Meio fluido tioglicolato Caldo de peptona de soja e caseína	20 a 25 30 a 35
Fungos			
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Caldo de peptona de soja e caseína	20 a 25
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Caldo de peptona de soja e caseína	20 a 25

Para o controle positivo, os meios foram inoculados com os micro-organismos mencionados, utilizados alças de inoculação descartáveis, também dentro da cabine de segurança biológica classe II.

Tanto os meios de controle negativo quanto positivo foram incubados nas temperaturas mencionadas por 3 dias. A incubação dos microorganismos anaeróbios foi realizada em uma estufa microprocessada de cultura bacteriológica (Sterillifer, Diadema, Brasil), e a dos microorganismos aeróbios foi realizada em uma incubadora *shaker* SL 223 (Solab Científica, Piracicaba, Brasil). Após o período de incubação, o aspecto dos meios foi analisado e registrado através de fotografias.

Após a validação dos meios de cultura, passou-se para a etapa de validação do processo de esterilização em si (Figura 14). Para isso, as amostras esterilizadas foram retiradas da embalagem, então três pequenos pedaços (triplicata) foram cortados e submersos nos meios de cultura. O protótipo completo foi quebrado na metade, sendo cada uma incubada em um meio. Todo esse procedimento foi realizado na cabine de segurança biológica, para que não houvesse contaminação externa.

Tanto as amostras quanto o protótipo foram incubados em condição anaeróbia e aeróbia, utilizando os mesmos meios, temperaturas e tempo de cultura mencionados. O aspecto físico dos meios de cultura após o período de incubação foi avaliado e registrado através de foto.

Figura 14. Fluxograma mostrando a validação do processo de esterilização propriamente dita (cultura das amostras esterilizadas).

ETAPA 2

Fonte: autoria própria.

4.5. Desempenho hidrodinâmico do protótipo

Esta etapa foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Ovandir Bazan, o Prof. Dr. Jayme Pinto Ortiz e o Prof. Dr. Jurandir Itizo Yanagihara, no laboratório de Mecânica dos Fluidos do Departamento de Mecatrônica e Sistemas Mecânicos da Escola Politécnica da USP.

Os objetivos principais desta etapa eram: 1) verificar se o arcabouço era minimamente funcional, ou seja, se os folhetos eram capazes de abrir e fechar; e 2) se ele era capaz de suportar fluxo e uma certa pressão, dado que o objetivo final do projeto é submeter o arcabouço a uma cultura celular em biorreator (o que não necessariamente precisa ser realizado exatamente na

pressão a qual está submetida a VA). A técnica utilizada para isso foi o PIV (do inglês, *Particle Image Velocimetry*), onde a distribuição de velocidade instantânea em um plano é obtida através da determinação fotográfica do deslocamento de partículas sinalizadoras, que se encontram imersas no fluido, em um intervalo muito curto de tempo (121).

Para simular o ciclo cardíaco, foi utilizado um simulador de coração esquerdo desenvolvido por Bazan e Ortiz, cuja instrumentação, controle e aquisição de dados podem ser encontrados em detalhes nas referências aqui citadas (122,123). O simulador foi ajustado com os seguintes parâmetros: frequência cardíaca de 60 bpm com duração da sístole de 400 ms, volume sistólico de 70 mL, e volume diastólico final de 120 mL. A pressão aórtica foi aumentada sucessivamente até atingir 80 por 120 mmHg.

O fluido utilizado foi uma solução de 37% V/V de glicerol em água a $21 \pm 0,5$ °C, devido à sua viscosidade ser próxima à do sangue e também por possuir um índice de refração compatível com a técnica de PIV.

O arcabouço utilizado para o teste foi fabricado conforme descrito na seção 3.2, porém com uma pequena modificação: antes da fabricação dos folhetos, uma saia de poli(tereftalato de etileno) (PET) (comercialmente conhecido como Dacron®) foi costurada ao redor do *stent* para promover a fixação do dispositivo no simulador (Figura 15). Devido ao fato da base do *stent* ser curva e o suporte do equipamento ser reto, só um material macio e flexível, como é o caso do Dacron®, poderia ser utilizado para que a vedação fosse suficiente.

Figura 15. Saia de PET costurada ao longo do *stent* para fixação no equipamento de ensaio hidrodinâmico.

Fonte: autoria própria.

O sistema PIV utilizado (Dantec Dynamics A/S, Skovlunde, Dinamarca) era composto por: um par de laser pulsados de Nd:YAG (Litron Lasers Ltd., Rugby, Inglaterra), uma câmera CCD (do inglês, *Charged-Couple Device*), e um filtro óptico (532 nm). Uma travessa ISEL Microstep Controller C142-4 (ISEL Automation KG, Eichenzell, Alemanha) foi utilizada para o posicionamento da câmera e do laser. As partículas utilizadas foram esferas S-HGS (Dantec Dynamics A/S, Skovlunde, Dinamarca) de 10 μm , de vidro recoberto com prata.

Devido a limitações nos equipamentos utilizados, o arcabouço só pôde ser testado na posição mitral (sendo confeccionado com um diâmetro externo de 31 mm para melhor encaixe), e na posição aórtica foi colocada uma prótese mecânica de duplo folheto (CarboMedics Inc., Texas, EUA, 27 mm diâmetro). Uma prótese porcina comercial (Epic, St. Jude Medical Inc., Minnesota, EUA, 27 mm diâmetro) foi utilizada como referência para a medição dos campos de velocidade do arcabouço. Esta prótese foi escolhida como controle (mesmo possuindo diâmetro diferente do arcabouço) por já ter sido completamente caracterizada na literatura e por não estar sob acordo de confidencialidade dentro do grupo de pesquisa do Prof. Jayme Ortiz.

O *setup* experimental completo é mostrado na Figura 16.

Figura 16. (A) Configuração experimental utilizada para a avaliação hidrodinâmica do arcabouço em diferentes vistas (S = *scaffold* e VA = valva aórtica) e (B) posicionamento das próteses no simulador.

Fonte: autoria própria/Eng. Dr. Ovandir Bazan.

Além dos mapas de velocidade, calculou-se a vorticidade ξ_z do fluxo no eixo z através da derivada dos mapas de vetores no plano x - y , conforme a Equação 1.

$$\xi_z = \frac{\partial v}{\partial x} - \frac{\partial u}{\partial y} \quad (\text{Eq. 1}),$$

sendo u e v , respectivamente, os componentes horizontal e vertical da velocidade no plano x - y .

5. RESULTADOS

5.1. Otimização do protótipo

Conforme mencionado anteriormente, o objetivo da otimização era gerar um *design* que maximizasse a estabilidade estrutural do *stent* através da retirada de material de pontos específicos apontados pelo MOT. O resultado gerado através do algoritmo de otimização é mostrado na Figura 17.

Figura 17. Resultado da otimização topológica aplicada ao *stent*.

Fonte: autoria própria/Prof. Dr. Ronny Calixto Carbonari.

Tomando como base essa resposta, o *stent* foi redesenhado da seguinte forma:

Figura 18. *Stent* curvo confeccionado em *software* CAD.

Fonte: autoria própria.

Para verificar o efeito da retirada do material na rigidez da estrutura, foi realizada uma simulação computacional. A comparação entre as tensões equivalentes de von Mises para os *stents* com base reta e curva é mostrada na Figura 19.

Figura 19. Tensões de von Mises obtidas para os dois modelos de *stent*.

Fonte: autoria própria/Prof. Dr. Ronny Calixto Carbonari.

Portanto, analisando as tensões mostradas na Figura 19, pode-se verificar que o resultado da otimização de fato apresenta uma melhor distribuição das tensões, havendo consequentemente uma diminuição dos valores encontrados. Ou seja, o MOT retirou material das regiões de baixa solicitação, sem prejuízos para o desempenho mecânico.

5.2. Fabricação do protótipo

5.2.1. *Stent*

A impressão 3D empregando PCL não apresentou qualidade satisfatória para a impressão do *stent*, pois a deposição de material foi desigual e com falhas, e o acabamento deixou a desejar, como pode ser visto na Figura 20. Isso ocorreu principalmente no que diz respeito às áreas com angulações superiores a 30°, portanto, mesmo testando diferentes parâmetros e posições de impressão, foi necessário deixar a base reta (como era antes da otimização topológica).

Figura 20. Resultados da impressão do *stent* em PCL, vistas em perspectivas diferentes.

Fonte: autoria própria.

Já a impressão em PLA (Figura 21) resultou em uma qualidade altamente satisfatória, pois houve uma deposição uniforme do material e com bom acabamento. Foi apenas necessário lixar as partes que ficam em contato com o suporte (utilizado para descolar mais facilmente a peça da mesa). Mesmo com a base curva, não foi preciso utilizar material de suporte (além do que fica na mesa de impressão) para sustentar as partes mais anguladas.

Figura 21. Resultados da impressão do *stent* em PLA, vistas em perspectivas diferentes.

Fonte: autoria própria.

Não foi possível realizar testes de impressão 3D com polímeros biorreabsorvíveis de grau médico, pois não foram encontrados filamentos com qualidade satisfatória ou que atendessem aos requisitos necessários para o uso na impressora utilizada.

5.2.2. Folhetos

Os folhetos fabricados utilizando a técnica de FSS seguiram muito fielmente o formato do molde utilizado, em grande parte devido ao acoplamento do mesmo à bomba de vácuo, e atingiram uma boa coaptação, conforme mostra a Figura 22.

Figura 22. Fotografia do protótipo finalizado, com os folhetos depositados sobre o *stent* (e sobre o bordelete de PET).

Fonte: autoria própria.

A junção do material dos folhetos com os demais materiais é imperceptível, pois há a formação de uma camada contínua sobre toda a estrutura. Essa característica é importante, pois, caso houvessem emendas, esses locais seriam muito mais propensos à falha.

5.3. Validação da esterilização das amostras

O aspecto físico das amostras, a olho nu, permaneceu inalterado, como mostra a Figura 23.

Figura 23. Fotografia das amostras após a esterilização, ainda na embalagem utilizada no processo.

Os controles negativo e positivo demonstraram o resultado esperado, portanto foi possível prosseguir para a etapa 2 da validação. As fotografias das amostras fibrosas esterilizadas e incubadas por três dias são mostradas na Figura 24, e as fotografias dos protótipos esterilizados e incubados são mostradas na Figura 25.

Figura 24. Fotografia de amostras retangulares das membranas esterilizadas (triplicata), imersas em meio de cultura (A) caseína de soja e (B) tioglicolato, após cultura em estufa.

Fonte: autoria própria.

Figura 25. Fotografia do protótipo esterilizado, imerso em meio de cultura (A) caseína de soja e (B) tioglicolato, após cultura em estufa (uma metade em cada tubo).

Fonte: autoria própria.

Nota-se que para todas as amostras incubadas o meio de cultura permaneceu totalmente límpido, translúcido, o que indica que não houve crescimento de nenhum micro-organismo.

5.4. Caracterização das amostras e comparação

5.4.1. FTIR

O espectro da matéria-prima (Figura 26) foi comparado aos espectros obtidos para as mantas fibrosas (Figura 27) para verificar o processo de fabricação acarretou em alguma modificação química no polímero.

Figura 26. Espectro de FTIR do PCL fornecido pela Sigma-Aldrich.

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/spectra/ftir/FTIR002053.PDF>

Figura 27. Espectros médios (n = 3) de FTIR das amostras antes e depois da esterilização*

Fonte: autoria própria.

* devido a limitações do equipamento, só foi possível realizar a varredura a partir dos 500 cm⁻¹.

Observa-se que não ocorreram mudanças químicas significativas com a FSS, dado que as posições dos picos se mantêm. Como a intensidade dos picos depende do instrumento, das

condições e modo de operação, assim como do comprimento da trajetória óptica da amostra para qual foi obtida, não é possível realizar uma comparação direta desta característica.

Com relação às curvas referentes ao antes e depois do processo de esterilização, ocorre a mesma situação: as posições dos picos são as mesmas, porém as intensidades diferem.

5.4.2. MEV

A Figura 28 e a Figura 29 mostram imagens representativas de MEV das amostras obtidas.

Figura 28. Micrografia capturada com uma magnificação baixa, permitindo observar distribuição das fibras na amostra.

Fonte: autoria própria.

Verifica-se que há majoritariamente a formação de fibras, que se encontram bem distribuídas pela amostra, e muitas vezes formam feixes maiores.

Figura 29. Micrografia evidenciando a formação de feixes de fibras nas amostras.

Fonte: autoria própria.

É também possível observar poucas partículas arredondadas, porém elas aparecem em pequena quantidade e aparentam ser porosas (Figura 30), o que leva a crer que elas não prejudicam a proliferação das células através do arcabouço.

Figura 30. Micrografia ressaltando a morfologia das partículas encontradas em meio às fibras.

Fonte: autoria própria.

Após a esterilização, é possível verificar que as mesmas características gerais (ou seja, predominância de fibras, formação de alguns feixes e partículas) foram mantidas, conforme mostra a Figura 31.

Figura 31. Micrografia mostrando a microestrutura de uma amostra esterilizada.

Fonte: autoria própria.

5.4.3. Quantificação do alinhamento e diâmetro das fibras

O alinhamento das fibras dificilmente seria alterado pelo processo de esterilização utilizado, porém sua caracterização é importante para compreender outras características das amostras, como suas propriedades mecânicas.

As análises qualitativas e quantitativas do alinhamento das fibras para as amostras não esterilizadas e esterilizadas são mostradas na Figura 32.

Figura 32. Análise qualitativa do alinhamento das fibras nas amostras não esterilizadas (1A e 1B) e após a esterilização (2A e 2B), em duas regiões diferentes. Cada cor representa um ângulo diferente, conforme mostra a legenda. Barra de escala em micrometros (μm). Abaixo delas, os respectivos gráficos que mostram a quantificação do alinhamento.

Fonte: autoria própria.

Através da vasta gama de cores presentes nas micrografias, já se percebe que não houve apenas uma direção de alinhamento preferencial. Uma concentração maior de cores ocorreu apenas nos feixes de fibras.

Em relação à análise quantitativa é importante ressaltar que, como as amostras (e suas respectivas micrografias) podem ser rotacionadas, o ângulo de um pico *per se* não oferece informações relevantes. É preciso analisar todos os picos em conjunto, pois é das diferenças de ângulo entre eles, assim como das suas respectivas intensidades, que se obtém uma imagem representativa da amostra. Tendo isso em vista, a Figura 33 detalha gráficos da distribuição do alinhamento mostrados na Figura 32.

Figura 33. Gráficos detalhados da distribuição do alinhamento das amostras esterilizadas e não esterilizadas, com as informações mais relevantes em destaque.

Nota-se que, mesmo dentro de uma mesma amostra, o alinhamento variou consideravelmente. A região 1B (não esterilizada) se mostrou a mais aleatória de todas; ela possui somente um pico de amplitude 116° , ou seja, não houve uma direção preferencial. A região 2B (esterilizada) é semelhante, porém foram detectados quatro picos mais intensos, o

que indica uma menor aleatoriedade. As demais regiões demonstraram uma maior concentração de fibras em determinados ângulos, porém a relação entre os picos difere. Enquanto na região 1A (não esterilizada) a diferença entre os principais picos é de 117°, na região 2A (esterilizada) ela é de 105°.

A Tabela 1 mostra os dados numéricos obtidos na análise do diâmetro das fibras nas amostras analisadas.

Tabela 1. Informações numéricas referentes ao diâmetro das fibras das amostras.

	Amostras não esterilizadas	Amostras esterilizadas
Média $\pm$ desvio padrão (nm)	461,4 $\pm$ 197,6	431,9 $\pm$ 148,6
Menor diâmetro (nm)	177,2	194
Maior diâmetro (nm)	1335,2	908,4

Fonte: autoria própria

Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras para as amostras não esterilizadas e esterilizadas são mostrados na Figura 34. A contagem totaliza 100 fibras por histograma, pois para cada condição foram analisadas 50 fibras em duas regiões diferentes.

Figura 34. Histogramas da distribuição dos diâmetros das fibras antes e depois da esterilização.

Fonte: autoria própria.

A maioria das fibras encontra-se na faixa dos 200 a 700 nm em ambos os casos. Certamente, existem fibras com diâmetros inferiores a 100 nm que não são puderam ser medidas devido a limitações do *software* ImageJ. No entanto, a presença delas deve ser menos frequente, como foi visto para as fibras com diâmetros superiores a 900 nm.

5.4.4. Ensaios de tração

As curvas de tensão X deformação em ambas direções, perpendiculares entre si, são mostradas na Figura 35.

Figura 35. Curvas médias de tensão X deformação sob tração (com desvio) das amostras, obtidas em duas direções perpendiculares entre si. As amostras não esterilizadas são representadas pelas curvas com símbolos quadrados, e as não esterilizadas, por símbolos triangulares.

Fonte: autoria própria.

Para as amostras não esterilizadas, as curvas nas duas direções praticamente se sobrepuseram, indicando que o comportamento das amostras deve estar próximo do isotrópico. De fato, a aleatoriedade na deposição das fibras verificada através da análise de imagens teve reflexos nas propriedades mecânicas das mantas. Já para as amostras esterilizadas, houve uma mudança no comportamento em uma das direções.

Por se tratar de um ensaio destrutivo, não é possível testar a mesma amostra antes e depois da esterilização; portanto, uma comparação direta dessa propriedade não pode ser realizada. Tendo isso em vista, pode-se afirmar apenas que as amostras esterilizadas não apresentaram resistência mecânica inferior à das amostras não esterilizadas.

Para ambas as condições, como as curvas não possuem regiões Hookeanas, não foi possível extrair o valor de módulo de Young do material.

5.4.5. Ângulo de contato

O valor médio de ângulo de contato obtido para as amostras não esterilizadas foi de $130,09^\circ \pm 0,91^\circ$. Após a esterilização, o valor obtido foi de $135,04^\circ \pm 0,41^\circ$.

Como a manta fibrosa possui um certo volume de vazio, a gota de água não entra em contato com todo o material da amostra e, dessa forma, as medidas de molhabilidade obtidas para materiais fibrosos não podem ser analisados quantitativamente (104). Dessa forma, analisando qualitativamente, percebe-se que a esterilização não causou mudanças relevantes nessa característica do material.

Ambos os valores são significativamente mais altos quando comparados ao de uma membrana densa do mesmo material ($77,73 \pm 1,15$) (105), porém não necessariamente as mantas aqui analisadas são muito mais hidrofóbicas. A maior área superficial decorrente das fibras pode explicar uma elevação no ângulo de contato, porém a presença de ar nos espaços vazios (porosidade) nestas mantas pode apontar para um aumento maior do que o real.

5.4.6. Desempenho biológico

O comportamento das células quando em cultura sobre o material foi analisado com relação à morfologia, distribuição e atividade celular. Os testes foram realizados para as amostras submetidas ao processo de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio e para amostras não submetidas a este processo.

Nessa análise qualitativa (Figura 36), em ambos os casos, as células se mostraram distribuídas por todo o material, com algumas regiões de maior concentração, e apresentaram núcleo com cromatina descondensada e nucléolo evidente. Algumas células possuíam formato mais alongado, seguindo a orientação da fibra.

A atividade celular também foi similar: a coloração com o AT mostrou a presença de células com basofilia metacromática, e a coloração com o XP indicou células com intensa acidofilia. Esses dados apontam para um alto nível de atividade celular.

Figura 36. Análise morfológica e citoquímica das células Vero cultivadas sobre a manta fibrosa não esterilizada e sobre a manta esterilizada. CV = cristal violeta, AT = azul de toluidina, XP = xilidina ponceau. Barra de escala: 50 μ m.

Fonte: autoria própria/Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr.

Estes resultados sugerem que as mantas fibrosas não são citotóxicas para as células, e o que o processo de esterilização também não deixou resíduos tóxicos.

5.5. Desempenho hidrodinâmico

O primeiro resultado proveniente do teste hidrodinâmico é que o arcabouço não sofreu ruptura nem da base nem dos folhetos durante os trinta minutos de teste, onde foram utilizadas pressões de até 120 mmHg. Apesar da duração do teste ter sido muito limitada e do protótipo ter sido testado na posição mitral, estes resultados são encorajadores e levam a crer que este arcabouço possa ser condicionado em biorreator. Testes de maior duração ainda devem ser realizados futuramente, principalmente para verificar a possibilidade de uso como VA.

A Figura 37 mostra os mapas de vetores de velocidade combinados às representações de vorticidade para a prótese controle e para o arcabouço durante a diástole (com intervalos de 100 ms), ou seja, quando a VM (posição estudada) deve permitir o fluxo sanguíneo do átrio para o ventrículo. A localização das próteses valvares no simulador é a mesma mostrada na Figura 16.

Figura 37. Mapa de vetores de velocidade no plano xy durante a diástole para a prótese da *St. Jude Medical* e o arcabouço. As linhas pretas contínuas enfatizam vórtices no eixo z.

Fonte: autoria própria/Eng. Dr. Ovandir Bazan

As linhas em vermelho representam as velocidades máximas, sendo que os valores obtidos foram de 0,8 m/s e 0,6 m/s para a prótese da St. Jude Medical e para o arcabouço, respectivamente. Estas velocidades encontram-se na mesma ordem de grandeza, porém não podem ser diretamente comparadas devido à diferença no diâmetro do orifício efetivo dos dispositivos: como na prótese comercial o fluido deve passar através de uma área menor, sua velocidade é aumentada.

Com relação à vorticidade, para a prótese comercial os vórtices principais se movimentam para cima e para baixo por duas vezes, de forma rápida, durante a diástole. Já no caso do arcabouço, essa movimentação é mais gradual e, ao final, o vórtice se mantém em uma posição fixa no meio da região de interesse. Isso indica que o arcabouço permitiu um fluxo suave do fluido, sem grandes perturbações, através do ventrículo.

Na Figura 38, estão representados os vetores de velocidade durante a sístole, ou seja, quando o sangue é ejetado do ventrículo e a VM deve impedir o fluxo retrógrado para o átrio. O fluxo através da VA é mostrado no quadrante inferior direito da imagem, e o fluxo próximo à VM (onde o arcabouço se encontra) é mostrado no quadrante superior esquerdo.

Figura 38. Mapas de vetores de velocidade obtidos durante o pico de pressão na sístole.

Fonte: autoria própria/Eng. Dr. Ovandir Bazan

Pode-se verificar através desse resultado, ao menos de forma qualitativa, que as velocidades registradas próximas à VM são relativamente baixas. Estas velocidades são referentes tanto a fluido regurgitado quanto a flutuações nos ventrículos. Isso leva a crer que a regurgitação apresentada pelo arcabouço deve estar dentro dos limites toleráveis (estabelecidos através de normas como a ISO 5910:2018, por ser uma característica que existe em todas as próteses valvares).

6. DISCUSSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se dizer que o *design* do protótipo, assim como os materiais e técnicas de fabricação escolhidos são adequados para a aplicação, apesar de alguns ajustes ainda serem necessários. O protótipo cumpriu sua função mecânica (durante um teste inicial bastante breve) e as amostras fibrosas (semelhantes aos folhetos) permitiram a adesão e a proliferação celulares. Quanto ao processo de esterilização, ele foi eficaz e não alterou as propriedades do arcabouço que foram avaliadas (químicas, mecânicas, morfológicas). Para facilitar a discussão detalhada destes pontos, eles serão divididos em tópicos.

Design e processos de fabricação

A otimização do protótipo foi bem-sucedida, visto que resultou em uma redução da tensão de von Mises em todo o *stent* mesmo com uma redução na quantidade de material utilizada.

A MA por FDM foi considerada interessante pelo seu custo relativamente baixo (equipamento de R\$ 3.200,00 reais, e com fabricação nacional) e por ter atingido o formato desejado, que é complexo. Também é possível fabricar *stents* de vários tamanhos diferentes apenas modificando a escala da peça no *software* de CAD. Uma desvantagem é que ela deve ser adaptada de polímero para polímero, e nem sempre o ajuste de seus parâmetros permite obter uma qualidade de impressão adequada. Outro problema observado é que, como nem todos os biomateriais são comumente utilizados em aplicações industriais, a maioria dos equipamentos comerciais não opera com tais polímeros e o conhecimento sobre os parâmetros de impressão deles são mais limitados.

O PCL havia sido escolhido porque, segundo a literatura, polímeros que apresentam degradação e absorção bastante lentas (no caso do PCL, ela pode ser superior a 24 meses) são mais aconselháveis para o desenvolvimento de arcabouços para ETVC, em comparação com o PGA, que possui absorção muito rápida (de 1,5 a 6 meses) (84). A impressão com o PCL não se mostrou satisfatória, e também não poderia ser considerado como processo definitivo no momento por não se tratar de um material de grau médico.

Por este motivo, outras alternativas, como o PLDLA produzido no Laboratório de Biomateriais da PUC-SP, foram buscadas: ele possui um tempo de degradação intermediário, porém ainda lento (estimado entre 12 e 16 meses), e já foi testado em animais (124–126). Infelizmente, o diâmetro do filamento não estava uniforme o suficiente para ser utilizado na impressora 3D, porém acredita-se que é possível obter resultados satisfatórios através de

estudos mais aprofundados. Outra possibilidade seria persistir na procura por opções comercialmente disponíveis.

Com relação à técnica de FSS, ela foi interessante principalmente devido ao baixo custo e à maior segurança quando comparado à eletrofiação, técnica utilizada na maioria dos trabalhos da área. A FSS também se mostrou muito eficiente no recobrimento de moldes, mantendo quase que fielmente o formato desejado, principalmente com a incorporação da bomba de vácuo na metodologia. Além disso, ela não modifica as características químicas da matéria-prima e resulta em uma distribuição homogênea de fibras. No entanto, um quesito importante a ser aprimorado é a reprodutibilidade deste processo, que ainda é considerado artesanal. Visando transpor este obstáculo, foi estabelecida uma colaboração com o Laboratório de Automação à Vida do Instituto Federal de São Paulo (IFSP), que está estudando maneiras de automatizar o controle da movimentação do aerógrafo e a medição da espessura das mantas fibrosas. Espera-se que um dos frutos futuros dessa parceria seja um sistema automatizado para a produção dos arcabouços, em um modelo similar ao da JetValve™ (98).

Caso seja necessário adaptar as características físicas do arcabouço (como dimensões do *stent*, espessura e curvatura dos folhetos etc.), estas técnicas poderão ser utilizadas seguindo praticamente os mesmos protocolos de fabricação já estabelecidos.

Esterilização

A esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio mostrou-se eficaz, visto que não foi observado crescimento de micro-organismos no teste de inoculação direta. O processo não causou modificações químicas ou morfológicas nas amostras, e nem alterou as propriedades mecânicas ou o desempenho biológico delas, indicando que ele pode ser considerado um processo em potencial para este dispositivo. O próximo passo para confirmar a viabilidade do uso desse processo seria caracterizar o desempenho hidrodinâmico do protótipo esterilizado.

Características gerais das amostras e do protótipo

No que diz respeito às propriedades mecânicas das mantas fibrosas, quando o alvo (coletor) não possui movimento rotativo, as fibras são depositadas de forma aleatória e tendem a apresentar um comportamento próximo ao isotrópico (127), como observado para as amostras não esterilizadas. Nas amostras esterilizadas, no entanto, uma das direções apresentou um comportamento diferente. Provavelmente, essa fato se deve à diferença no alinhamento das fibras (mostrada na Figura 33) e também, possivelmente, a uma proporção diferente de feixes

ou partículas em relação às fibras, e não devido ao processo de esterilização em si. Apesar da deposição aleatória, seria possível um arranjo deste tipo ocorrer em algum momento.

Como os componentes da MEC dos folhetos nativos apresentam diferentes orientações preferenciais, vários trabalhos da literatura buscam um alinhamento diferenciado das fibras de arcabouços para ETVC (86,98). Essa preocupação, que está principalmente relacionada às propriedades mecânicas iniciais do arcabouço, é essencial para a ET *in situ*, porém não necessariamente para a ET *in vitro*, que é a abordagem pretendida para este trabalho.

Na ET *in vitro*, o arcabouço deve ser primeiramente semeado com células e condicionado em biorreator para o crescimento de tecido. Ou seja, ele pode ser submetido a pressões próximas (e não necessariamente equivalentes) à fisiológica, que poderão ser controladas no equipamento, e suas características (incluindo a resistência à tração e à fadiga, por exemplo) serão alteradas conforme o tecido é formado. O esperado é que, apesar da degradação do polímero, a estrutura se torne mais resistente devido à formação e organização da MEC. Deve-se ressaltar que, futuramente, caso a anisotropia seja considerada fundamental ou caso se deseje mudar a abordagem do trabalho, já foi comprovado que é possível produzir fibras alinhadas com a técnica de FSS, e seria necessário somente uma adaptação na metodologia (127).

O desempenho hidrodinâmico do arcabouço mostrou que seu *design* parece estar adequado, pois ele suportou as pressões impostas sem romper e cumpriu sua função, permitindo o fluxo durante sua abertura e com regurgitação leve durante o fechamento. Este foi um teste inicial realizado na posição mitral, portanto, não é possível afirmar que ele se comportaria exatamente da mesma forma para as posições aórtica ou pulmonar (devido às diferenças na localização anatômica, dimensões e pressões às quais estão submetidas), porém ainda são resultados encorajadores e que fornecem uma ideia da resistência e da flexibilidade dos folhetos.

Quanto ao desempenho biológico, alguns autores mostram preocupação com materiais hidrofóbicos para a fabricação de arcabouços para a ET, pois alegam que eles dificultam a proliferação celular e a difusão de nutrientes (128). No entanto, apesar das mantas fibrosas terem apresentarem ângulos de contato superiores a 90° (o que caracteriza, teoricamente, materiais altamente hidrofóbicos), houve uma interação positiva das células com o substrato. As células Vero mostraram aderência ao substrato e mantiveram um alto nível de atividade celular, demonstrando que tanto o material escolhido para os folhetos como a microestrutura obtida são interessantes para a ET. O diâmetro médio das fibras, que está de acordo com o que é recomendado para a ET (50-500 nm de diâmetro, por ser a ordem de magnitude das proteínas

da MEC dos tecidos nativos), também pode ter favorecido esta interação (129). Outros tipos celulares e cultura em biorreator ainda devem ser testados para melhor avaliar a adequação do material para esta aplicação.

Não é possível comparar diretamente os resultados encontrados neste trabalho com os da literatura, especialmente porque ainda não se sabe qual (ou quais) a abordagem experimental mais adequada para a área. São muitos materiais, técnicas de fabricação e estágios de desenvolvimento diferentes para que se possa estabelecer comparações. No entanto, considera-se que o uso de técnicas de fabricação simples, baratas e amplamente disponíveis é um dos destaques deste projeto em relação a outras metodologias apresentadas na literatura.

7. CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o arcabouço desenvolvido neste trabalho é funcional e suporta condições mínimas para cultura em biorreator. O fato dele ter suportado pressões de até 120 mmHg (mesmo que por pouco tempo) indica que ele tem potencial para ser um substituto não só de VP, mas de VA também.

O material demonstrou não ser citotóxico, pois as células cultivadas sobre as mantas fibrosas foram capazes de se aderir e proliferar sobre o substrato, apresentando altos níveis de atividade celular.

O processo de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio cumpriu seu papel e não alterou as propriedades das amostras analisadas, o que indica que ele é um candidato viável para a esterilização do protótipo.

Dessa forma, conclui-se que o protótipo proposto neste trabalho pode ser considerado um potencial arcabouço para a ETVC, pois, a princípio, cumpre sua função mecânica, poderá ser submetido à cultura em biorreator, não é citotóxico e pode ser esterilizado sem alterações em suas propriedades.

Os resultados apresentados neste trabalho são importantes e encorajadores, sendo parte inicial de um grande e longo projeto que visa à obtenção de um produto. As pesquisas mundiais na área de ETVC vêm sendo realizadas há mais de 20 anos, mas, no Brasil, pouco se investiu neste tema ao longo dos últimos anos. As pesquisas na área encontram-se em grande desvantagem financeira e estrutural, o que certamente impactará negativamente o acesso a estas tecnologias no país. Por este motivo, acredita-se que projetos que visam à nacionalização de tecnologias na área de saúde devem ser estimulados.

8. TRABALHOS FUTUROS

Como trabalhos futuros, podem ser destacados:

- Impressão do *stent* usando materiais que possuem grau médico. Para isso, seria necessário aperfeiçoar o processo de fabricação do filamento, para que ele tenha diâmetro mais uniforme e possa ser utilizado na impressora 3D disponível;
- Realizar outros testes para melhor avaliar o desempenho hidrodinâmico do protótipo, principalmente testando-o nas posições da VA e VP;
- Realizar cultura celular com outros tipos de célula, como as endoteliais, para que se possa afirmar de fato que ele é adequado para a ETVc em específico;
- Realizar a cultura celular dinâmica em biorreator, para verificar a organização tecidual, a degradação do material e também como o crescimento das células influencia a geometria do arcabouço e resistência mecânica (consequentemente, sua a funcionalidade) ao longo do tempo. A princípio, essas informações seriam utilizadas pensando na engenharia tecidual *in vitro*, porém caso os resultados sejam promissores, há a possibilidade de visar à engenharia tecidual *in situ* também, mesmo que para um substituto de VP.
- Automatização do processo de fabricação, para melhorar a reprodutibilidade do processo e sua produtividade, pois atualmente ele é quase artesanal e depende bastante da habilidade da pessoa que o utiliza.

9. PUBLICAÇÕES

Periódicos

- **Simbara, M.M.O.**, Pimenta, F.A., Carbonari, R.C., Andrade, A.J.P., Malmonge, S.M. A review on fibrous scaffolds in cardiovascular tissue engineering. Innovative Biomedical Technologies and Health Care (IBTHC). 2017, 1(1): 14 – 28.
- **Simbara, M.M.O.**, Santos Jr., A.R., Andrade, A.J.P., Malmonge, S.M. Comparative study of aligned and non-aligned poly(ϵ -caprolactone) (PCL) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning. J Biomed Mater Res Part B. 2019, 107B(5): 1462-1470.
- Bazan, O., **Simbara, M.M.O.**, Ortiz, J.P., Malmonge, S.M., Andrade, A.J.P., Yanagihara, J.I. In Vitro Hydrodynamic Evaluation of a Scaffold for Heart Valve Tissue Engineering. Artificial Organs. 2019, 43(2): 195-206.
- Hell, A.F., **Simbara, M.M.O.**, Rodrigues, P., Kakazu, D.A., Malmonge, S.M. Production of fibrous polymer scaffolds for tissue engineering using an automated solution blow spinning system. Res Biomed Eng. 2018, 34(3): 273-278.

Congressos

- **Simbara, M.M.O.**, Carbonari, R.C., Andrade, A.J.P., Malmonge, S.M. Projeto e fabricação de arcabouços para válvulas cardíacas utilizando a técnica de *airbrushing*: simulação vs. prática. In: 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais – OBI, 2017, Maresias.
- **Simbara, M.M.O.**, Santos Jr., A.R., Andrade, A.J.P., Malmonge, S.M. Synchrotron computed microtomography as a tool for the assessment of cell proliferation in polymer scaffolds for tissue engineering. In: XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, 2018, Búzios.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4):242–68.
2. John R, Liao KK. Heart Valve Disease. In: Iaizzo PA, organizador. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices.* Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 527–49.
3. Edwards Lifesciences Comércio de Produtos Médico-Cirúrgicos Ltda. *Cirurgia de Válvula Cardíaca: Informações que Todos os Pacientes Devem Saber* [Internet]. 2005 [citado 2 de outubro de 2017]. p. 20. Available at: www.edwards.com/br/products/heartvalves/pages/manualpaciente.aspx
4. Sacks MS, Merryman WD, Schmidt DE. On the Biomechanics of Heart Valve. *J Biomech.* 2009;42(12):1804–24.
5. d'Arcy JL, Prendergast BD, Chambers JB, Ray SG, Bridgewater B. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. *Heart.* 2011;97(2):91–3.
6. Coffey S, Cairns BJ, Iung B. The modern epidemiology of heart valve disease. *Heart.* 2016;102(1):75–85.
7. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J.* 2012;33(19):2451–96.
8. Ribeiro GS, Tartof SY, Oliveira DWS, Guedes ACS, Reis MG, Riley LW, et al. Surgery for valvular heart disease: A population-based study in a Brazilian urban center. *PLoS One.* 2012;7(5).
9. Freire K do ES, Carvalho MA, Brito TA, Menezes MS. Valve surgery: results of the brazilian public health system ‡ . *Brazilian J Med Hum Heal.* 2014;2(2):75–81.
10. Zilla P, Brink J, Human P, Bezuidenhout D. Prosthetic heart valves: Catering for the few. *Biomaterials.* 2008;29(4):385–406.
11. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. Vol. 139, *Circulation.* 2019. 56–528 p.

12. Brown JM, O'Brien SM, Wu C, Sikora JAH, Griffith BP, Gammie JS. Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: Changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(1):82–90.
13. Maganti K, Rigolin VH, Sarano ME, Bonow RO. Valvular Heart Disease: Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(5):483–500.
14. Fuster V, Harrington RA, Eapen ZJ, Narula J. *Hurst's the Heart.* 14th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2017. 2208 p.
15. Kheradvar A, Groves EM, Goergen CJ, Alavi SH, Tranquillo R, Simmons CA, et al. Emerging Trends in Heart Valve Engineering: Part II. Novel and Standard Technologies for Aortic Valve Replacement. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(4):844–57.
16. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: Selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation.* 2009;119(7):1034–48.
17. Milburn K, Bapat V, Thomas M. Valve-in-valve implantations: Is this the new standard for degenerated bioprostheses? Review of the literature. *Clin Res Cardiol.* 2014;103(6):417–29.
18. Tillquist MN, Maddox TM. Cardiac crossroads: Deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement. *Patient Prefer Adherence.* 2011;5:91–9.
19. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science (80-).* 1993;260(5110):920–6.
20. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011;14(3):88–95.
21. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004;22(2):80–6.
22. Chapekar MS. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(6):617–20.
23. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater.* 2009;8(6):457–70.
24. Kheradvar A, Groves EM, Dasi LP, Alavi SH, Tranquillo R, Grande-Allen KJ, et al. Emerging Trends in Heart Valve Engineering: Part I. Solutions for Future. *Ann*

- Biomed Eng. 2015;43(4):833–43.
25. Cheung DY, Duan B, Butcher JT. Current Progress in Tissue Engineering of Heart Valves: Multiscale Problems, Multiscale Solutions. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;8(5):583–92.
  26. Charitos EI, Sievers H-H. Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013;2(1):53–6.
  27. Yacoub MH, Takkenberg JJM. Will heart valve tissue engineering change the world? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005;2(2):60–1.
  28. Borghi A, New SEP, Chester AH, Taylor PM, Yacoub MH. Time-dependent mechanical properties of aortic valve cusps: Effect of glycosaminoglycan depletion. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4645–52.
  29. Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng.* 2006;34(12):1799–819.
  30. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: The continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation.* 2008;118(18):1864–80.
  31. Vesely I. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech.* 1997;31(2):115–23.
  32. World Health Organization. Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Geneva, Switzerland; 2016.
  33. Tarasoutchi F, Montera M, Grinberg M, Barbosa M, Piñeiro D, Sánchez C, et al. Diretriz Brasileira de Valvopatias - SBC 2011/ I Diretriz Interamericana de Valvopatias - SIAC 2011. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(5):01–67.
  34. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(3):162–72.
  35. World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. 2018.
  36. Marijon E, Ou P, Celermajer DS, Ferreira B, Mocumbi AO, Jani D, et al. Prevalence of Rheumatic Heart Disease Detected by Echocardiographic Screening. *N Engl J Med.* 2007;357(5):470–6.

37. de Aquino Xavier RM, Azevedo VMP, Godoy PH, Migowski A, Ribeiro ALP, Chaves RBM, et al. Medium-term outcomes of 78,808 patients after heart valve surgery in a middle-income country: A nationwide population-based study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017;17(1):1–10.
38. Mordi I, Tzemos N. Bicuspid aortic valve disease: A comprehensive review. Vol. 1, *Cardiology Research and Practice.* 2012.
39. Matthews AM. The development of the Starr-Edwards heart valve. *Texas Hear Inst J.* 1998;25(4):282–93.
40. Ozkokeli, M Ates, M. Ekinici, A Akcar M. Thirty-Seven-Year Durability of a Starr-Edwards Aortic Prosthesis. *Texas Hear Inst J.* 2005;32:99–101.
41. Blot WJ, Ibrahim MA, Ivey TD, Acheson DE, Brookmeyer R, Weyman A, et al. Twenty-five-year experience with the Björk-Shiley convexoconcave heart valve: A continuing clinical concern. *Circulation.* 2005;111(21):2850–7.
42. Seiler C. Management and follow up of prosthetic heart valves. *Heart.* 2004;90(7):818–24.
43. Schoen FJ, Gotlieb AI. Heart valve health, disease, replacement, and repair: a 25-year cardiovascular pathology perspective. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25(4):341–52.
44. Mol A, Bouten C V, Baaijens FP, Zund G, Turina MI, Hoerstrup SP. Review article: Tissue engineering of semilunar heart valves: current status and future developments. *J Hear Valve Dis.* 2004;13(2):272–80.
45. Dunning J, Gao H, Chambers J, Moat N, Murphy G, Pagano D, et al. Aortic valve surgery: Marked increases in volume and significant decreases in mechanical valve use - An analysis of 41,227 patients over 5 years from the Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain and Ireland National database. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142(4):776-782.e3.
46. Kidane AG, Burriesci G, Cornejo P, Dooley A, Sarkar S, Bonhoeffer P, et al. Current developments and future prospects for heart valve replacement therapy. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2009;88(1):290–303.
47. Costa FDA da, Abuchaim D, Haggi Filho H, Poffo R, Gaspar R, Rosa GS da, et al.

- Homoenxerto mitral: uma realidade. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. julho de 1998;13(3).
48. Arsalan M, Walther T. Durability of prostheses for transcatheter aortic valve implantation. *Nat Publ Gr*. 2016;13(6):360–7.
  49. Mylotte D, Andalib A, Thériault-Lauzier P, Dorfmeister M, Girgis M, Alharbi W, et al. Transcatheter heart valve failure: A systematic review. *Eur Heart J*. 2015;36(21):1306–27.
  50. Toggweiler S. How to reduce costs in transcatheter aortic valve implantation. *Open Hear*. 2014;1(1):e000203.
  51. Eusanio M Di, Phan K, Bouchard D, Carrel TP, Dapunt OE, Di R, et al. Sutureless Aortic Valve Replacement International Registry (SU- AVR-IR): design and rationale from the International Valvular Surgery Study Group (IVSSG). *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;4(2):131–9.
  52. Eusanio M Di, Phan K. Sutureless aortic valve replacement. *Ann Thorac Surg*. 2015;4(2):123–30.
  53. Bacha EA, McElhinney DB, Guleserian KJ, Colan SD, Jonas RA, del Nido PJ, et al. Surgical aortic valvuloplasty in children and adolescents with aortic regurgitation: Acute and intermediate effects on aortic valve function and left ventricular dimensions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(3).
  54. Urich T. Giving children a heart valve that can grow with them [Internet]. Thriving - Boston Children's Hospital's Pediatric Health Blog. 2012 [citado 6 de junho de 2017]. Available at: <https://thriving.childrenshospital.org/giving-children-a-heart-valve-that-can-grow-with-them/>
  55. Schultz M. Hello Medtronic, Doctors, and FDA – It Begins [Internet]. 2014 [citado 6 de junho de 2017]. Available at: <https://melodyvalve.org/2014/04/03/hello-medtronic-doctors-and-fda-it-begins/>
  56. Mol A, Smits AIPM, Bouten CVC, Baaijens FPT. Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(3):259–75.
  57. Sengupta D, Waldman SD, Li S. From in vitro to in situ tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2014;42(7):1537–45.

58. Schmidt D, Stock UA, Hoerstrup SP. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007;362(June):1505–12.
59. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys.* 2011;49(12):832–64.
60. Keane TJ, Badylak SF. Biomaterials for tissue engineering applications. *Semin Pediatr Surg.* 2014;23(3):112–8.
61. Chen Q-Z, Harding SE, Ali NN, Lyon AR, Boccaccini AR. Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Mater Sci Eng R Reports.* 2008;59(1):1–37.
62. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008;17(SUPPL. 4).
63. Dijkman PE, Driessen-Mol A, Frese L, Hoerstrup SP, Baaijens FPT. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials.* 2012;33(18):4545–54.
64. O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Black KS, Elkins R, Clarke D. The SynerGraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;11(4 Suppl 1):194–200.
65. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2003;23(6):1002–6.
66. Brown JW, Ruzmetov M, Eltayeb O, Rodefeld MD, Turrentine MW. Performance of SynerGraft decellularized pulmonary homograft in patients undergoing a Ross procedure. *Ann Thorac Surg.* 2011;91(2):416–23.
67. Miller D V., Edwards WD, Zehr KJ. Endothelial and smooth muscle cell populations in a decellularized cryopreserved aortic homograft (SynerGraft) 2 years after implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(1):175–7.
68. Sarikouch S, Horke A, Tudorache I, Beerbaum P, Westhoff-Bleck M, Boethig D, et al.

- Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: A decade of clinical experience. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2016;50(2):281–90.
69. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Pruss A, Konertz W. Ten Years of Clinical Results With a Tissue-Engineered Pulmonary Valve. *Ann Thorac Surg*. 2011;92(4):1308–14.
  70. Theodoridis K, Tudorache I, Calistru A, Cebotari S, Meyer T, Sarikouch S, et al. Successful matrix guided tissue regeneration of decellularized pulmonary heart valve allografts in elderly sheep. *Biomaterials*. 2015;52(1):221–8.
  71. Fioretta ES, Dijkman PE, Emmert MY, Hoerstrup SP. The future of heart valve replacement: recent developments and translational challenges for heart valve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):e323–35.
  72. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. Tissue engineering heart valves: Valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(SUPPL. 3).
  73. Breuer CK, Shin'oka T, Tanel RE, Zund G, Mooney DJ, Ma PX, et al. Tissue engineering lamb heart valve leaflets. *Biotechnol Bioeng*. 1996;50(5):562–7.
  74. Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Egozy a, Stock U, Mayer JE, et al. Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2000;6(2):183–8.
  75. Weber B, Scherman J, Emmert MY, Gruenenfelder J, Verbeek R, Bracher M, et al. Injectable living marrow stromal cell-based autologous tissue engineered heart valves: First experiences with a one-step intervention in primates. *Eur Heart J*. 2011;32(22):2830–40.
  76. Schmidt D, Mol A, Breymann C, Achermann J, Odermatt B, Gössi M, et al. Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors. *Circulation*. 2006;114(SUPPL. 1):125–32.
  77. Schmidt D, Mol A, Odermatt B, Neuenschwander S, Breymann C, Gössi M, et al. Engineering of biologically active living heart valve leaflets using human umbilical cord-derived progenitor cells. *Tissue Eng*. 2006;12(11):3223–32.

78. Mol A, Driessen NJB, Rutten MCM, Hoerstrup SP, Bouten CVC, Baaijens FPT. Tissue engineering of human heart valve leaflets: A novel bioreactor for a strain-based conditioning approach. *Ann Biomed Eng.* 2005;33(12 SPEC. ISS.):1778–88.
79. Cox M a J, Kortsmits J, Driessen N, Bouten CVC, Baaijens FPT. Tissue-engineered heart valves develop native-like collagen fiber architecture. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(5):1527–37.
80. Emmert MY, Weber B, Wolint P, Behr L, Sammut S, Frauenfelder T, et al. Stem cell-based transcatheter aortic valve implantation: First experiences in a pre-clinical model. *JACC Cardiovasc Interv.* 2012;5(8):874–83.
81. Emmert MY, Weber B, Behr L, Frauenfelder T, Brokopp CE, Grnenfelder J, et al. Transapical aortic implantation of autologous marrow stromal cell-based tissue-engineered heart valves: First experiences in the systemic circulation. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011;4(7):822–3.
82. Rabkin E, Hoerstrup SP, Aikawa M, Mayer JE, Schoen FJ. Evolution of cell phenotype and extracellular matrix in tissue-engineered heart valves during in-vitro maturation and in-vivo remodeling. *J Heart Valve Dis.* 2002;11(3):308—14; discussion 314.
83. Brugmans MMCP, Driessen-Mol A, Rubbens MP, Cox MAJ, Baaijens FPT. Poly-E-caprolactone scaffold and reduced in vitro cell culture: Beneficial effect on compaction and improved valvular tissue formation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(12):E289–301.
84. Brugmans MMCP, Soekhradj-Soechit RS, Van Geemen D, Cox M, Bouten CVCC, Baaijens FPTT, et al. Superior Tissue Evolution in Slow-Degrading Scaffolds for Valvular Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(1–2):123–32.
85. Gaudio C Del, Bianco A, Grigioni M. Electrospun bioresorbable trileaflet heart valve prosthesis for tissue engineering: in vitro functional assessment of a pulmonary cardiac valve design. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;44(2):178–86.
86. Hobson CM, Amoroso NJ, Amini R, Ungchusri E, Hong Y, D’Amore A, et al. Fabrication of elastomeric scaffolds with curvilinear fibrous structures for heart valve leaflet engineering. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2015;103(9):3101–6.
87. Kluin J, Talacua H, Smits AIP., Emmert MY, Brugmans MCP, Fioretta ES, et al. In

- situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant – from material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials*. 2016;submitted:101–17.
88. Masoumi N, Annabi N, Assmann A, Larson BL, Hjortnaes J, Alemdar N, et al. Tri-layered elastomeric scaffolds for engineering heart valve leaflets. *Biomaterials*. setembro de 2014;35(27):7774–85.
  89. Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv Mater*. 2004;16(14):1151–70.
  90. Simbara MMO, Carbonari RC, Malmonge SM. Scaffold prototype for heart valve tissue engineering: Design and material analyses. In: *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, 2015. 2015. p. 292–5.
  91. Tutak W, Sarkar S, Lin-Gibson S, Farooque TM, Jyotsnendu G, Wang D, et al. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials*. 2013;34(10):2389–98.
  92. Simbara MMO, Pimenta FA, Carbonari RC, Andrade AJP, Malmonge SM. A review on fibrous scaffolds in cardiovascular tissue engineering. *Innov Biomed Technol Heal Care (IBTHC)*. 2017;1(1):14–28.
  93. Apte SS, Paul A, Prakash S, Shum-tim D. Current developments in the tissue engineering of autologous heart valves. *Future Cardiol*. 2011;7(1):77–97.
  94. Simionescu DT, Chen J, Jaeggli M, Wang B, Liao J. Form Follows Function: Advances in Trilayered Structure Replication for Aortic Heart Valve Tissue Engineering. *J Healthc Eng*. 2012;3(2):179–202.
  95. Shi Y, Ramamurthi A, Vesely I. Towards tissue engineering of a composite aortic valve. *Biomed Sci Instrum*. 2002;38:35—40.
  96. Vesely I, Shi Y, Dobkin D, Iyer R, Soundararajan A. Progress in developing a composite tissue-engineered aortic valve. In: *Conference proceedings : . Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference*. 2005. p. 7129–30.
  97. Neidert MR, Tranquillo RT. Tissue-Engineered Valves with Commissural Alignment.

- Tissue Eng. 2006;12(4):891–903.
98. Capulli AK, Emmert MY, Pasqualini FS, Kehl D, Caliskan E, Lind JU, et al. JetValve: Rapid manufacturing of biohybrid scaffolds for biomimetic heart valve replacement. *Biomaterials*. 2017;133:229–41.
  99. Hong H, Dong GN, Shi WJ, Chen S, Guo C, Hu P. Fabrication of Biomatrix/Polymer Hybrid Scaffold for Heart Valve Tissue Engineering in Vitro. *Asaio J*. 2008;54(6):627–32.
  100. Hong H, Dong N, Shi J, Chen S, Guo C, Hu P, et al. Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: An in vitro study. *Artif Organs*. 2009;33(7):554–8.
  101. Jahnavi S, Kumary T V., Bhuvaneshwar GS, Natarajan TS, Verma RS. Engineering of a polymer layered bio-hybrid heart valve scaffold. *Mater Sci Eng C*. 2015;51:263–73.
  102. Weber B, Dijkman PE, Scherman J, Sanders B, Emmert MY, Grünenfelder J, et al. Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model. *Biomaterials*. 2013;34(30):7269–80.
  103. Reimer JM, Syedain ZH, Haynie BHT, Tranquillo RT. Pediatric tubular pulmonary heart valve from decellularized engineered tissue tubes. *Biomaterials*. 2015;62:88–94.
  104. Driessen-Mol A, Emmert MY, Dijkman PE, Frese L, Sanders B, Weber B, et al. Transcatheter implantation of homologous “off-the-shelf” tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: Long-term functionality and rapid in vivo remodeling in sheep. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(13):1320–9.
  105. Bouten CVC. Intelligent materials for in-situ heart valve tissue engineering (ImaValve) - Final publishable summary report. 2017.
  106. Kluin J, Talacua H, Smits AIPM, Emmert MY, Brugmans MCP, Fioretta ES, et al. In situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant – From material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials*. 2017;125:101–17.
  107. Stassen OMJA, Muylaert DEP, Bouten CVC, Hjortnaes J. Current Challenges in Translating Tissue-Engineered Heart Valves. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2017;19(9).
  108. Emmert MY, Weber B, Behr L, Sammut S, Frauenfelder T, Wolint P, et al.

Transcatheter aortic valve implantation using anatomically oriented, marrow stromal cell-based, stented, tissue-engineered heart valves: Technical considerations and implications for translational cell-based heart valve concepts. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2014;45(1):61–8.

109. Simbara MMO. Utilização da técnica de airbrushing na fabricação de arcabouço polimérico de válvula cardíaca sem suturas [dissertação]. Santo André: Universidade Federal do ABC; 2015.
110. Rutala WA, Weber DJ, HIPAC. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2008.
111. Moriya GA de A, Souza RQ, Camargo TC, Graziano KU. Métodos de esterilização a baixa temperatura. In: Carvalho R, organizador. *Enfermagem em Centro de Material, Biossegurança e Bioética*. Barueri: Manole; 2015. p. 99–133.
112. Bendsoe MP, Sigmund O. *Topology Optimization: Theory, Methods, and Applications*. Springer Berlin Heidelberg; 2013. 370 p.
113. Kim NH, Sankar B V. *Introduction to Finite Element Analysis and Design*. Wiley; 2008. 423 p.
114. Silveira ZDC, Stoshy M de F. Design development and functional validation of an interchangeable head based on mini screw extrusion applied in an experimental desktop 3-D printer. *Int J Rapid Manuf.* 2014;4(1):49–65.
115. Daristotle JL, Behrens AM, Sandler AD, Kofinas P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(51):34951–63.
116. Rezakhaniha R, Agianniotis A, Schrauwen JTC, Griffa A, Sage D, Bouten CVC, et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol.* 2012;11(3–4):461–73.
117. Kirkpatrick CJ. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: Cytotoxicity in vitro. *Regul Aff.* 1992;4:13–32.
118. Lison L. *Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes*. Gauthier-Villars;

1960. (Collection des actualités biologiques).
119. Mello MLS. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Brazilian J Genet.* 1997;20(2):257–64.
  120. United States Pharmacopoeial Convention. <71> Sterility Tests. In: *US Pharmacopeia.* 2016.
  121. Cengel YA, Cimbala JM. *Fluid Mechanics Fundamentals and Applications.* McGraw-Hill Education; 2013. 1024 p.
  122. Bazan O, Ortiz JP. Experimental validation of a cardiac simulator for in vitro evaluation of prosthetic heart valves. *Brazilian J Cardiovasc Surg.* 2016;31(2):151–7.
  123. Bazan O, Ortiz JP, Fukumasu NK, Pacifico AL, Yanagihara JI. Influence of Tricuspid Bioprosthesis Mitral Valve Orientation Regarding the Flow Field Inside the Left Ventricle: In Vitro Hydrodynamic Characterization Based on 2D PIV Measurements. *Artif Organs.* 2016;40(2):175–9.
  124. Liao S, Chan CK, Ramakrishna S. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2008;28(8):1189–202.
  125. Más BA, Freire DC de L, Cattani SM de M, Motta AC, Barbo MLP, Duek EA de R. Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application. *Mater Res.* 2016;19(2):300–7.
  126. Leal CV, dos Santos Almeida R, Dávila JL, Domingues JA, Hausen MA, Duek EAR, et al. Characterization and in vitro evaluation of electrospun aligned-fiber membranes of poly(L-co-D,L-lactic acid). *J Appl Polym Sci.* 2019;136(24):1–9.
  127. Simbara MMO, Santos AR, Andrade AJP, Malmonge SM. Comparative study of aligned and nonaligned poly(ϵ -caprolactone) fibrous scaffolds prepared by solution blow spinning. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 28 de setembro de 2018;
  128. Sarkar S. Utilizing Hydrophobic/Hydrophilic Interactions in Biomaterials: Old Dog, New Tricks! *Biomaterials Forum.* 2013;35(2):14–6.
  129. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. Vol. 59, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007. p. 1413–33.

130. SBA. Terminologia anatômica internacional. Manole; 2001. 248 p.