

# O papel e o progresso dos biorreatores na engenharia tecidual de valvas cardíacas

Fabiana Costa e Silva  
Faculdade de Engenharia Elétrica  
Universidade Federal de Uberlândia  
Uberlândia, Brazil  
ORCID: 0000-0003-3297-2202

Nathalia Lopes Lima Santos  
Faculdade de Engenharia Elétrica  
Universidade Federal de Uberlândia  
Uberlândia, Brazil  
ORCID: 0000-0002-1416-0123

Márcia Mayumi Omi Simbara  
Faculdade de Engenharia Elétrica  
Universidade Federal de Uberlândia  
Uberlândia, Brazil  
ORCID: 0000-0003-2249-0488

**Abstract**—The increasing number of patients diagnosed with valvular heart disease, whose main treatment consists in the replacement of this structure, and the limitations of currently available prostheses highlight the need for new alternatives for implantation. *In vitro* tissue engineering, a field that has undergone great advancements over the years, proposes the cultivation of cells in a three-dimensional matrix subjected to various stimuli to induce tissue formation. Therefore, it has great potential to develop a substitute capable of growth, repair, and remodeling as a response to the complex mechanical demands of the physiological environment. Bioreactors are widely used in the culture process, as they are capable of simulating in a controlled way the mechanical and chemical stimuli to which the valves are subjected and, thereby, contribute to cell proliferation, alignment, and differentiation. This review aims to present the different existing bioreactor models for the conditioning of tissue engineered heart valves and how their concepts and designs have changed over the years.

**Keywords** — heart valves, tissue engineering, dynamic culture, bioreactor

## I. INTRODUÇÃO

As doenças cardíacas valvares (VHD, do inglês *valvular heart disease*) são patologias cardíacas estruturais que acometem uma ou mais das valvas do coração. Como são responsáveis por garantir a unidirecionalidade do fluxo sanguíneo, valvas doentes podem prejudicar a função do coração. Enquanto no passado uma das principais causas de VHD era a doença reumática cardíaca (RHD, do inglês *rheumatic heart disease*), percebe-se hoje um significativo aumento das VHD não-reumáticas, principalmente a calcificação da valva aórtica (CAVD, do inglês *calcific aortic valve disease*) [1].

De acordo com o estudo *Global Burden Disease* de 2017, do Instituto de Métricas e Avaliação de Saúde da Universidade de Washington, a incidência global de RHD diminuiu em 8,67% entre 1990 e 2017, enquanto a de não-reumáticas aumentou em 45,10% no mesmo período – com destaque para o aumento em 18,80% de incidência de CAVD. Pode-se associar a diminuição de casos de RHD à divulgação em 1954 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de diretrizes voltadas para a prevenção e para o tratamento da doença [1]; enquanto o aumento na incidência de doenças cardíacas degenerativas pode ser relacionado com o envelhecimento da população e o aumento da expectativa de vida [2].

O número crescente de pacientes com VHD e as perspectivas para o futuro geram preocupação para os sistemas de saúde, pois os custos de pesquisa e tratamento das VHD são altos e é necessário um acompanhamento a longo prazo do paciente [2]. Atualmente, a principal opção de tratamento consiste na substituição da valva por uma prótese,

e as duas principais categorias disponíveis são as mecânicas e as biológicas. As válvulas mecânicas possuem alta durabilidade, mas são propensas à infecção, à inflamação e à trombose, o que torna necessário o uso de anticoagulantes; já as biopróteses, feitas a partir de tecido animal ou humano, possuem melhor hemocompatibilidade, mas têm menor durabilidade, devido principalmente à calcificação dos folhetos com o tempo, e risco de imunogenicidade [3].

De acordo com Harken (1989), um dos pioneiros nas cirurgias de valvas cardíacas, existem dez características que uma prótese valvar ideal deve possuir [4], e a partir delas é possível compreender que tal substituto deve ser capaz de se autorreparar, remodelar, crescer e ser resistente a infecções e trombogênicidade – conjunto de características que nenhuma das atuais válvulas no mercado possui integralmente. No entanto, o significativo avanço em pesquisas relacionadas com engenharia tecidual de valvas cardíacas (HVTE, do inglês *heart valve tissue engineering*) demonstra grande potencial para o desenvolvimento de substitutos capazes de cumprir tais requisitos e que ofereçam uma alternativa melhor para os pacientes, principalmente geriátricos e pediátricos.

O primeiro passo para a formação de tecido através da HVTE *in vitro* é cultivar células em uma matriz tridimensional, normalmente chamada de *scaffold* ou arcabouço. Essa matriz deve ser fabricada com um material biocompatível e biodegradável, pois dá suporte inicial às células, mas se torna desnecessário conforme o tecido se desenvolve. Equipamentos chamados biorreatores podem ser utilizados para complementar o processo de cultura celular. Eles visam simular o microambiente fisiológico nativo, direcionando o desenvolvimento do tecido para que ele adquira características mecânicas e histológicas adequadas para a aplicação, sendo assim capaz de realizar a sua função com eficiência e segurança [5].

No caso das valvas cardíacas, o uso de biorreatores é particularmente importante devido à complexidade do tecido, que possui uma estrutura otimizada para resistir às elevadas solicitações mecânicas do ciclo cardíaco. Tendo em vista a importância desse equipamento para o sucesso da valva cardíaca desenvolvida por engenharia tecidual (TEHV, do inglês *tissue engineered heart valve*), esta revisão visa apresentar os diferentes tipos de biorreatores existentes atualmente que podem ser utilizados na área, e cujas especificações devem ser determinadas a partir da escolha da valva a ser substituída e dos estímulos mecânicos e químicos que serão empregados.

## II. FISIOLOGIA E PATOLOGIA DAS VALVAS CARDÍACAS

O coração humano possui quatro valvas, responsáveis por garantir a unidirecionalidade do fluxo sanguíneo. Elas podem ser divididas em atrioventriculares (valvas mitral e tricúspide), que separam as câmaras atriais das ventriculares, e

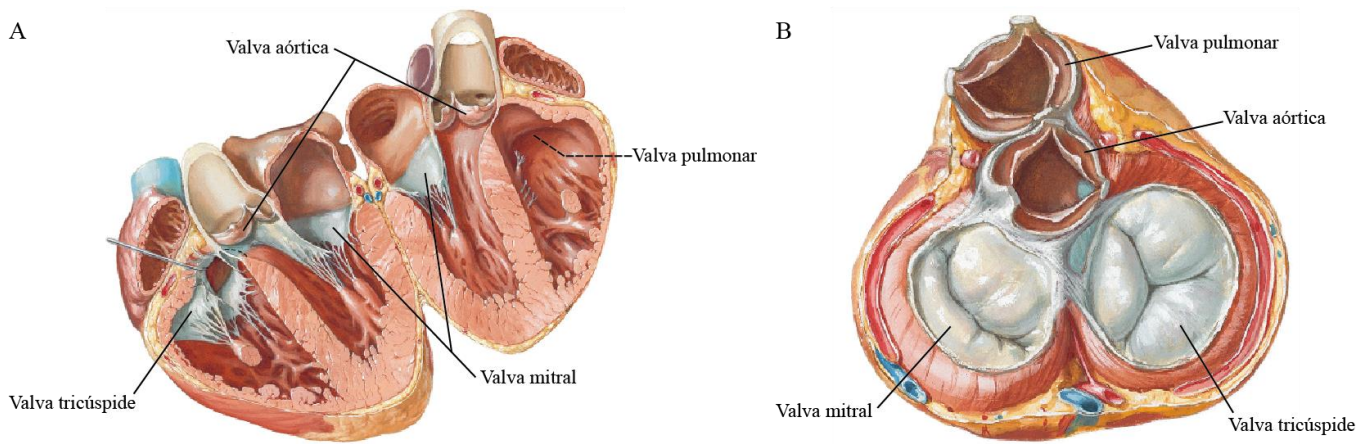


Fig. 1. Estrutura anatômica das valvas cardíacas. (A) Corte sagital. (B) Vista superior com átrios removidos. A valva mitral faz a conexão entre o átrio e o ventrículo esquerdos, e a tricúspide entre os do lado direito. A valva aorta está posicionada entre o ventrículo esquerdo e a artéria aorta, e a pulmonar entre o direito e a artéria tronco pulmonar [6].

semilunares (valvas aórtica e pulmonar), que separam os ventrículos das artérias aorta e tronco pulmonar, respectivamente (Figura 1) [7]. Elas abrem e fecham mais de 100 mil vezes por dia, 40 milhões de vezes por ano e 3 bilhões de vezes em um período de 75 anos, suportando complexas condições e demandas que variam muito ao longo do ciclo cardíaco [3][7].

Devido às variações de pressão durante a sístole e a diástole, todas as valvas estão sujeitas à tração, flexão e cisalhamento. Valvas saudáveis são capazes de suportar essas tensões mantendo e adaptando continuamente sua constituição e, justamente por este motivo, as valvopatias estão relacionadas com uma interação anormal entre as células valvares, a matriz extracelular e o seu ambiente [7]. As VHD se manifestam principalmente através da regurgitação, que consiste no refluxo do sangue devido a um fechamento incompleto da valva, ou da estenose, caracterizada por uma redução na passagem do fluxo sanguíneo, comumente associada ao acúmulo de cálcio na sua estrutura [5].

As solicitações mecânicas no lado esquerdo do coração são consideravelmente maiores do que no lado direito e, por isso, as valvas do lado esquerdo costumam ser mais lesionadas, tanto em proporção quanto em gravidade [8]. A mitral é, dentre todas as quatro, a que sofre mais trauma e, notadamente, a regurgitação mitral é a forma mais prevalente de VHD no mundo, apesar de possuir um impacto clínico menor. Isso pode ser explicado pelo fato de o reparo da valva com regurgitação mitral ser preferível, pois está associada a uma melhor qualidade de vida, com taxas de mortalidade e morbidade menores que a substituição [9].

A valva aórtica é a segunda mais frequentemente acometida por doenças e quase 30% dos indivíduos acima de 65 anos possuem esclerose, patologia na qual o fluxo é reduzido, porém não totalmente obstruído. Entretanto, devido a importante conexão hemodinâmica dessa valva, a esclerose aumenta em 50% o risco de morte por infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou outras doenças cardiovasculares, e, caso não seja devidamente tratada, pode se agravar para uma estenose [10]. O tratamento, na maioria dos casos, envolve a substituição da valva doente, pois a cirurgia de reparo muitas vezes não pode ser realizada e as taxas de mortalidade associadas são significantes [11].

### III. ENGENHARIA TECIDUAL: A GRANDE PROMESSA NO TRATAMENTO DE VHD

Devido ao crescente número de casos de VHD, novas áreas da tecnologia estão sendo exploradas para o tratamento e substituição de valvas doentes, entre elas a engenharia tecidual (TE, do inglês *tissue engineering*). Esta área pode ser 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 do tecido” [12]. Ela se baseia em três elementos primordiais, conhecidos como tríade da engenharia tecidual: as células, os arcabouços e os estímulos.

As células são os componentes principais da formação de neotecido e são cultivadas sobre arcabouços, que dão suporte para a adesão, migração e crescimento celular, e devem ter propriedades biomecânicas adequadas para as aplicações específicas. Eles devem também ser bioabsorvíveis, degradando-se em um ritmo compatível com a formação do tecido. Isso significa que ele deve exercer as funções mencionadas até que ocorra o processo de regeneração desejado, e que, ao final do processo, apenas o tecido natural do indivíduo restará [13].

Por este motivo, a escolha do material do arcabouço é tão importante. Arcabouços são constituídos por biomateriais, que são comumente definidos como “materiais destinados a fazer interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Os biomateriais podem ser de diferentes tipos: metais, cerâmicas, polímeros, compósitos ou até mesmo tecidos descelularizados [13], [14].

Para regeneração de tecidos moles, polímeros sintéticos como o ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) e ácido poli-dl-láctico-co-glicólico (PLGA), e polímeros naturais, como o colágeno e o alginato, são muito utilizados. Já para tecidos duros, são indicadas as cerâmicas como a hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcio (TCP) [14].

Os tecidos descelularizados, que podem ser de origem animal ou de doadores humanos cadavéricos, também são bastante empregados na regeneração tecidual. Eles são tecidos cujas células foram removidas, visando extinguir qualquer possível resposta imunológica do organismo receptor. A vantagem dessa abordagem é a manutenção da

arquitetura do tecido nativo, que contém traços de sinalização biológica, responsável por guiar a adesão e o crescimento celulares [13].

O terceiro pilar da TE são os estímulos, que podem ser de natureza mecânica, elétrica, química ou bioquímica, e que podem ser proporcionados por dispositivos como fatores de crescimento ou biorreatores [14].

#### A. Engenharia Tecidual de Valvas Cardíacas (TEHV)

As valvas cardíacas são estruturas complexas, e a interação entre células, arcabouços e estímulos ainda não é totalmente elucidada. Sabe-se, no entanto, que os principais componentes das valvas cardíacas, as células endoteliais valvulares (VECs), as células intersticiais valvulares (VICs), e a matriz extracelular (ECM) sofrem influência sob o condicionamento dinâmico. Ou seja, o tecido é estruturado de acordo com as forças às quais ele é submetido, e se organiza em resposta a estímulos como tensão exercidas pelo fluido [5]. Portanto, para a obtenção de tecidos similares aos nativos, é necessário simular esse ambiente durante a cultura celular.

Os biomateriais utilizados em arcabouços na HVTE devem suportar tais tensões durante o período de cultura, e para isso devem ser, ao mesmo tempo, resistentes e flexíveis. Polímeros como o ácido poliglicólico (PGA), poli-4-hidroxitirato (P4HB), ácido polilático (PLLA), poli(glicerol sebacato) (PGS), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) já foram utilizados em pesquisas na área, com maior ou menor grau de sucesso [13], [15]. Os tecidos descelularizados também são muito explorados, principalmente os de origem bovina e porcina, como o pericárdio bovino [16].

Os dispositivos utilizados para submeter os arcabouços semeados com células a um ambiente semelhante aos fisiológico são chamados de biorreatores. Na verdade, além de serem responsáveis pelos estímulos que irão direcionar a organização tecidual [17], eles também otimizam a transferência de massa, a troca gasosa, e o controle de temperatura e pH do meio [18], o que resulta em melhores resultados de cultura celular.

O biorreator otimiza o crescimento celular por meio de sinais regulatórios, que padronizam a distribuição das células e estimulam a produção da ECM com propriedades mecânicas semelhantes às das valvas nativas [5]. Os estímulos mecânicos são transformados em respostas químicas em um processo conhecido como mecanotransdução, resultando em um alinhamento das células semelhante ao encontrado no tecido *in vivo*, o que não é possível obter em cultura estática, onde as células aparecem menos alongadas e distribuídas de maneira diferente (Figura 2) [17].

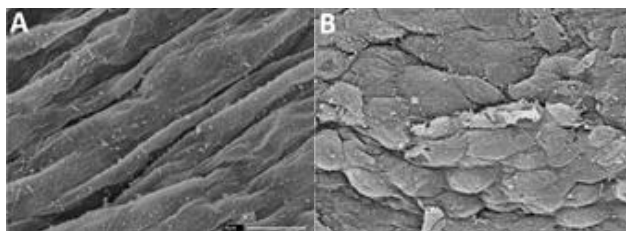


Fig. 2. Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura de válvulas de engenharia tecidual em condicionamento dinâmico de biorreator (A) e em condicionamento estático (B) [17].

#### IV. MODELOS DE BIORREATORES PARA HVTE

Um biorreator para HVTE deve ser constituído de material preferencialmente esterilizável e transparente [5], e conter ferramentas capazes de controlar a taxa de fluxo, pressão, temperatura, difusão de oxigênio e outros fatores [19]. Os principais módulos que ele deve possuir são: (i) uma bomba para impulsionar, de forma controlada, o fluido; (ii) um local para posicionar o *scaffold*, que deve ser submetido a um fluxo laminar e com perturbações mínimas; (iii) um elemento de capacitância, para armazenar e liberar energia durante o aumento súbito de pressão; (iv) um elemento de resistência, para controlar o sistema de pressão; (v) um reservatório de meio de cultura, que será o fluido presente no biorreator; e (vi) um local para troca de gases, essencial para manter os níveis de oxigenação adequados [19]. Também é interessante o uso de câmeras digitais para capturar imagens do arcabouço e analisar o seu funcionamento [13].

Existem diferentes possibilidades de *design* de biorreatores para TE, porém não existe nenhuma classificação oficialmente adotada. No entanto, os pesquisadores da área costumam categorizá-los de acordo com a principal fonte de estímulo utilizada: fluxo ou deformação. O primeiro busca simular as condições da sístole e da diástole, expondo o tecido a um ambiente mecânico muito próximo do fisiológico; o segundo, por sua vez, visa imitar apenas as etapas do ciclo cardíaco envolvendo a diástole [13], [20].

Os biorreatores baseados em deformação simulam a diástole pressurizando o meio de cultura, de forma cíclica, contra os folhetos da valva, mas de forma que ela permaneça fechada. Esse tipo de biorreator é baseado na suposição de que, como a maior deformação das valvas ocorre durante a diástole, essa técnica pode acelerar a formação e o desenvolvimento de tecido [13]. Mol *et al.* (2005) desenvolveram um modelo como esse, chamado Duplicador de Pulso Diastólico (DPD). O sistema consistia em um reservatório de meio de cultura e um biorreator onde a valva era posicionada. As duas câmaras eram conectadas através de dois tubos, e o meio circulava com ajuda de bombas de rolete e um pressurizador. Além disso, uma seringa com meio de cultura e ar era utilizada como elemento de complacência (Figura 3) [21].

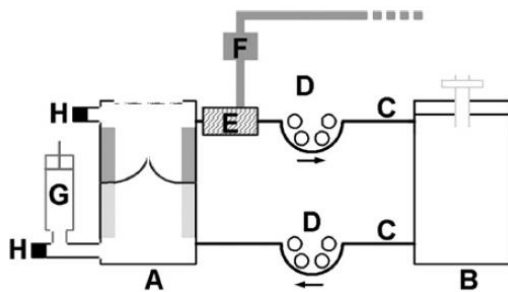


Fig. 3. Esquema do DPD, onde o biorreator (A) com a valva está conectado ao reservatório de meio de cultura (B) através de tubos de silicone paralelos (C). O fluido circula graças às bombas de rolete (D). Parte do tubo superior está envolto por um cilindro (E) conectado a uma válvula magnética (F), capaz de injetar ar no cilindro e comprimir o tubo em seu interior. Isso resultava em uma variação de pressão que impulsionava o fluido em direção a valva e a deformava. Além disso, estão representados a seringa (G), que atua como elemento de complacência, e os sensores de pressão (H) [21].

Através dessa técnica, eles aprimoraram a organização e as propriedades mecânicas do tecido formado em cultura dinâmica em relação ao controle, que permaneceu em cultura

estática [21]. No entanto, para se estudar o efeito de parâmetros aplicados no biorreator e avaliar possíveis alterações e aprimoramentos, é necessário um sistema de controle e monitoramento que o projeto de Mol *et al.* (2005) não possuía. Além disso, considerando a característica do *scaffold* de degradar à medida que há formação de tecido, as propriedades mecânicas da TEHV se alteram com o tempo. Assim, um sistema ideal deveria ser capaz de controlar e monitorar a tensão aplicada à valva e a deformação resultante ao longo do período de cultura [22]. Modelos assim foram desenvolvidos por Korsmit *et al.* (2009) e por Vismara *et al.* (2009), onde o primeiro utilizava a variação de volume do fluido que era empurrado para a valva a cada ciclo para estimar a deformação, e o segundo utilizava as pressões transvalvares com o mesmo intuito [22], [23].

Os biorreatores baseados em fluxo são mais presentes na literatura, porque visam expor o *scaffold* a todos os estímulos mecânicos que uma valva nativa experiencia. Eles atingem esse objetivo impulsionando o fluido através do arcabouço e criando gradientes de pressão que atuam abrindo e fechando os folhetos da valva. Um dos primeiros biorreatores desenvolvido para HVTE descrito na literatura foi um biorreator baseado em fluxo: Hoerstrup *et al.* (2000) construíram o que eles chamaram de câmara de fluxo pulsátil [13].

O projeto de Hoerstrup *et al.* (2000) possuía um *design* simples e era composto por um biorreator e um reservatório de meio de cultura (Figura 4). No biorreator, o arcabouço era posicionado em uma câmara superior contendo meio de cultura (2), a qual era separada de uma câmara de ar (1) por um diafragma de silicone (3). Quando ar era injetado nessa última câmara, o diafragma era pressionado e impulsionava o fluido através da estrutura (sístole) e em direção ao reservatório; quando o ar era sugado, o diafragma contraía enquanto o fluido descia em direção à câmara de ar (diástole) [24].

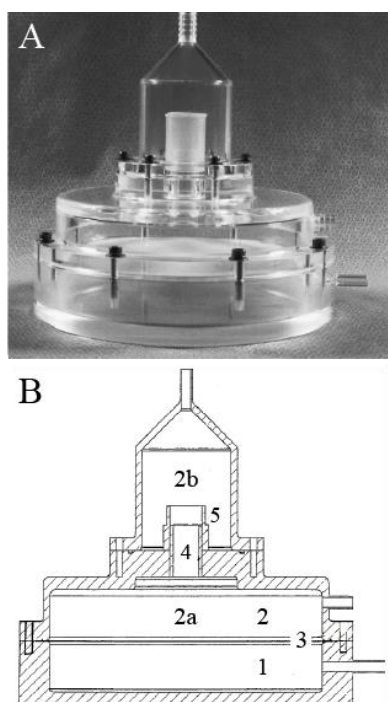


Fig. 4. Câmara de fluxo pulsátil. (A) Fotografia do modelo construído. (B) Esquema do projeto, onde a câmara de ar (1) era separada da câmara contendo meio de cultura (2) por um diafragma de silicone (3). Os dois compartimentos (2a e 2b) da câmara superior são conectados por um tubo de acrílico (4) em série com um tubo de silicone (5), onde era suturada a valva [24].

Esse modelo serviu como base para a criação de diversos outros biorreatores ao longo dos anos, porém é notável que os modelos vêm incluindo cada vez mais funcionalidades tanto para uma maior mimetização da fisiologia nativa, como para estudo de fenômenos [13]. Ziegelmüller *et al.* (2010), por exemplo, combinaram o biorreator com uma câmera para monitoramento óptico, para obter informações visuais da abertura e do fechamento dos folhetos e, com isso, analisar formas de aprimorar o desenvolvimento do substituto [25]. König *et al.* (2012), por sua vez, fez uso de um endoscópio para atingir o mesmo resultado (Figura 5) [26].

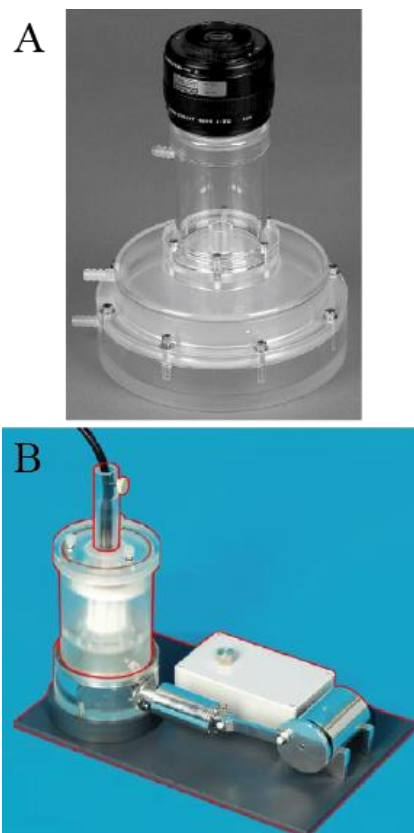


Fig. 5. Modelos desenvolvidos visando o monitoramento óptico dos folhetos das valvas através de (A) uma câmera [28] e de um (B) endoscópio [26].

Também tomando como base o trabalho de Hoerstrup *et al.* (2000), Sierad *et al.* (2010) propuseram um novo modelo de biorreator. Tal modelo possuía as mesmas câmaras e o fluido era propulsionado pelo mesmo método, porém eles incorporaram à estrutura elementos de capacitância e de resistência para atingir pressões fisiológicas. Era possível conectar um tanque pressurizado de complacência à saída da câmara aórtica e existiam válvulas de retenção ao longo dos tubos externos do biorreator para atuar como resistência periférica. Além disso, as câmaras ventricular e aórtica possuíam diversas portas para transdutores de pressão, e entradas e saídas para trocas do meio celular [27]. Já o biorreator proposto por Kassi *et al.* (2011) possui um *design* similar ao proposto por Sierad *et al.* (2010), porém utiliza um dispositivo de assistência ventricular, ao invés de uma bomba de ar comum, para simular a contração e o relaxamento do coração [17].

O desenvolvimento de biorreatores vai além de um projeto mecânico, e envolve cada vez mais áreas de conhecimento, como no caso do trabalho elaborado por Gosselin *et al.* (2019). Apesar de o funcionamento e os componentes serem similares aos dos projetos citados



anteriormente, o foco desta pesquisa era criar um sistema capaz de controlar as três principais variáveis que caracterizam o fluxo sanguíneo na valva aórtica – a taxa de fluxo, a pressão ventricular e a pressão aórtica. Para isso, os autores desenvolveram um controlador baseado em algoritmo genético capaz de analisar essas variáveis, testar novos parâmetros e aplicá-los até atingir um sistema com condições ideais ou próximas disso [28].

## V. CONCLUSÃO

O aumento expressivo da ocorrência de doenças valvares na população mundial demanda pesquisas que desenvolvam novas tecnologias, buscando melhorar a qualidade de vida do paciente e diminuir a necessidade de reoperações. A HVTE é um campo que pode contribuir nessa questão, pois visa à produção de substitutos valvares vivos, e que vem avançando consideravelmente nos últimos anos.

Uma das áreas necessárias para o progresso da HVTE é o projeto de biorreatores, equipamentos que mimetizam o ambiente celular na cultura *in vitro*, e promovem então a formação de um tecido mais semelhante ao nativo. No entanto, essa não é uma tarefa simples, pois a influência que os diferentes estímulos fisiológicos têm sobre as valvas cardíacas ainda não foi totalmente esclarecida.

O design dos biorreatores vem sendo aprimorado na tentativa também de elucidar tais mecanismos. Diferentes elementos estão sendo utilizados para replicar as condições de pressão e fluxo fisiológicos, e algumas pesquisas vem sendo direcionadas ao controle e medição desses e diversos outros parâmetros.

Espera-se, através de esforços como estes, que sejamos em breve capazes de produzir estruturas que solucionem, de forma definitiva, os problemas enfrentados por milhares de pessoas que sofrem com VHD.

## AGRADECIMENTOS

As autoras gostariam de agradecer ao Programa de Educação Tutorial (PET) e à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela concessão da bolsa institucional.

## REFERÊNCIAS

- [1] J. Chen, W. Li, and M. Xiang, “Burden of Valvular Heart Disease, 1990-2017: Results from the Global Burden of Disease Study 2017,” *J. Glob. Health*, vol. 10, no. 2, pp. 1–10, 2020, doi: 10.7189/jogh.10.020404.
- [2] S. Coffey, B. J. Cairns, and B. Lung, “The modern epidemiology of heart valve disease,” *Heart*, vol. 102, no. 1, pp. 75–85, 2016, doi: 10.1136/heartjnl-2014-307020.
- [3] A. Hasan *et al.*, “Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs,” *J. Biomech.*, vol. 47, no. 9, pp. 1949–1963, 2014, doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.09.023.
- [4] D. E. Harken, “Heart valves: Ten commandments and still counting,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 48, no. 3 SUPPL., pp. S18–S19, 1989, doi: 10.1016/0003-4975(89)90623-1.
- [5] P. Amrollahi and L. Tayebi, “Bioreactors for heart valve tissue engineering: A review,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 91, no. 4, pp. 847–856, 2016, doi: 10.1002/jctb.4825.
- [6] F. H. Netter, *Atlas De Anatomia Humana*, 6<sup>ª</sup>, vol. 6, no. 8. Saunders Elsevier, 2015.
- [7] K. M. Kodigepalli *et al.*, “Biology and biomechanics of the heart valve extracellular matrix,” *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/jcdd7040057.
- [8] J. E. Hall, *Tratado de Fisiologia Médica*, 12th ed. 2011.
- [9] E. Alegria-Barrero and O. W. Franzen, “Mitral regurgitation - a multidisciplinary challenge,” *Eur. Cardiol. Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 49–53, 2014, doi: 10.15420/ocr.2014.9.1.49.
- [10] J. T. Butcher, G. J. Mahler, and L. A. Hockaday, “Aortic valve disease

- and treatment: The need for naturally engineered solutions,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 4, pp. 242–268, 2011, doi: 10.1016/j.addr.2011.01.008.
- [11] D. Y. Cheung, B. Duan, and J. T. Butcher, “Current progress in tissue engineering of heart valves: Multiscale problems, multiscale solutions,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 15, no. 8, pp. 1155–1172, 2015, doi: 10.1517/14712598.2015.1051527.
  - [12] J. P. Vacanti and R. Langer, “Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation,” *Lancet*, vol. 354, no. SUPPL.1, pp. 32–34, 1999, doi: 10.1016/s0140-6736(99)90247-7.
  - [13] D. B. Spoon, B. J. Tefft, A. Lerman, and R. D. Simari, “Challenges of biological valve development,” *Interv. Cardiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 319–334, 2013, doi: 10.2217/ica.13.21.
  - [14] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
  - [15] N. Masoumi *et al.*, “Electrospun PGS: PCL Microfibers Align Human Valvular Interstitial Cells and Provide Tunable Scaffold Anisotropy,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 3, no. 6, pp. 929–939, 2014, doi: 10.1002/adhm.201300505.
  - [16] S. E. Motta, V. Lintas, E. S. Fioretta, S. P. Hoerstrup, and M. Y. Emmert, “Off-the-shelf tissue engineered heart valves for in situ regeneration: current state, challenges and future directions,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 15, no. 1, pp. 35–45, 2018, doi: 10.1080/17434440.2018.1419865.
  - [17] A. Kaasi, I. A. Cestari, N. A. G. Stolf, A. A. Leirner, O. Hassager, and I. N. Cestari, “A new approach to heart valve tissue engineering: mimicking the heart ventricle with a ventricular assist device in a novel bioreactor,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 5, no. 4, pp. 292–300, Apr. 2011, doi: 10.1002/term.315.
  - [18] B. J. Tefft *et al.*, “Cardiac Valve Bioreactor for Physiological Conditioning and Hydrodynamic Performance Assessment,” *Cardiovasc. Eng. Technol.*, vol. 10, no. 1, pp. 80–94, 2019, doi: 10.1007/s13239-018-00382-2.
  - [19] J. L. Berry, J. A. Steen, J. Koudy Williams, J. E. Jordan, A. Atala, and J. J. Yoo, “Bioreactors for development of tissue engineered heart valves,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 11, pp. 3272–3279, 2010, doi: 10.1007/s10439-010-0148-6.
  - [20] S. Parvin Nejad, M. C. Blaser, J. P. Santerre, C. A. Caldarone, and C. A. Simmons, “Biomechanical conditioning of tissue engineered heart valves: Too much of a good thing?,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 96, pp. 161–175, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.003.
  - [21] A. Mol, N. J. B. Driessen, M. C. M. Rutten, S. P. Hoerstrup, C. V. C. Bouten, and F. P. T. Baaijens, “Tissue engineering of human heart valve leaflets: A novel bioreactor for a strain-based conditioning approach,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 33, no. 12 SPEC. ISS., pp. 1778–1788, 2005, doi: 10.1007/s10439-005-8025-4.
  - [22] J. Kortsmmit, M. C. M. Rutten, M. W. Wijlaars, and F. P. T. Baaijens, “Deformation-controlled load application in heart valve tissue engineering,” *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 15, no. 4, pp. 707–716, 2009, doi: 10.1089/ten.tec.2008.0658.
  - [23] R. Vismara *et al.*, “A bioreactor with compliance monitoring for heart valve grafts,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 1, pp. 100–108, 2010, doi: 10.1007/s10439-009-9803-1.
  - [24] S. P. Hoerstrup, R. Sodian, J. S. Sperling, J. P. Vacanti, and J. E. Mayer, “New Pulsatile Bioreactor for In Vitro Formation of Tissue Engineered Heart Valves,” *Tissue Eng.*, vol. 6, no. 1, pp. 75–79, Feb. 2000, doi: 10.1089/107632700320919.
  - [25] J. A. Ziegelmüller *et al.*, “Optical monitoring during bioreactor conditioning of tissue-engineered heart valves,” *ASAIO J.*, vol. 56, no. 3, pp. 228–231, 2010, doi: 10.1097/MAT.0b013e3181cf3bdd.
  - [26] F. König *et al.*, “A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 3, pp. 480–496, 2012, doi: 10.3390/jfb3030480.
  - [27] L. N. Sierad *et al.*, “Design and Testing of a Pulsatile Conditioning System for Dynamic Endothelialization of Polyphenol-Stabilized Tissue Engineered Heart Valves,” *Cardiovasc. Eng. Technol.*, vol. 1, no. 2, pp. 138–153, 2010, doi: 10.1007/s13239-010-0014-6.
  - [28] J. Gosselin, A. Bégin-Drolet, Y. Maciel, and J. Ruel, “A New Approach Based on a Multiobjective Evolutionary Algorithm for Accurate Control of Flow Rate and Blood Pressure in Cardiac Bioreactors,” *Cardiovasc. Eng. Technol.*, vol. 11, no. 1, pp. 84–95, 2020, doi: 10.1007/s13239-019-00440-3.