

BIOIMPRESSÃO 3D: UMA BREVE APRESENTAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS

Guilherme Dekker – guidekker@gmail.com
Curso de Graduação em Engenharia Mecânica – UFSC
Florianópolis – SC

André Fensterseifer Schmidt – andre.fenst.schmidt@gmail.com
Curso de Graduação em Engenharia Mecânica – UFSC
Florianópolis – SC

***Resumo:** Bioimpressão 3D consiste na reprodução artificial de tecidos vivos utilizando uma impressora 3D. Trata-se de um desafio para as áreas de engenharia e medicina, e suas aplicações, possibilidades e repercussões são imensas. Será feita uma breve reflexão sobre o debate moral que envolve a utilização da tecnologia, e a exposição de algumas técnicas principais que vêm sendo desenvolvidas atualmente. Serão abordadas: impressão a laser, impressão por jato e impressão por extrusão, juntamente com suas respectivas vantagens e limitações comparativamente.*

***Palavras-chave:** bioimpressão, bioimpressora, bioengenharia, órgãos artificiais*

1 INTRODUÇÃO

Há sempre mais gente na fila de espera para transplante de órgãos do que doadores. No Brasil, segundo a revista Super Interessante [1], seriam necessários mais de 68 mil órgãos para sanar a demanda atual. A engenharia de tecidos é a arte de imitar tecidos naturais do corpo. É um campo com inúmeras possibilidades, pois além da óbvia aplicação de transplante de órgãos com total compatibilidade (em teoria), seria possível também o teste de novos medicamentos sem a necessidade de cobaias e a confecção de modelos, para auxiliar os cirurgiões com maquetes realistas do corpo e dos sistemas em que vão trabalhar, garantindo assim maior segurança nas cirurgias.

A abordagem tradicional da engenharia de tecidos consiste em semear células num esqueleto sintético (ou andaime). Esses andaimes tem diversas funções: eles garantem a integridade mecânica do órgão, permitem a adesão das células, permitem a distribuição de nutrientes e orquestram e direcionam a especialização e duplicação das células. Esse método permitiu muitos avanços, e até certo sucesso, no tecido ósseo e no tecido cartilaginoso por exemplo [2]. Contudo, ele vem encontrando limitações. A principal delas é a vascularização de tecidos mais espessos. No corpo humano, nenhuma célula fica a mais de 200 μm de um vaso sanguíneo, que irá prover oxigênio e nutrientes, bem como fará a remoção do gás carbônico [3]. Uma discussão mais aprofundada sobre os andaimes seguirá no artigo.

A bioimpressão 3D é o próximo passo da engenharia de tecidos. Consiste em um método de manufatura aditiva: impressoras 3D depositam camadas de células imersas em hidrogel para formar diferentes padrões de tecidos. Fornecendo excelente precisão no posicionamento, há três tipos de bioimpressão 3D. Impressão por laser, impressão por jato ou impressão por extrusão. Cada um dos tipos possuindo vantagens e limitações que serão discutidas.

Ainda restam muitos desafios na bioimpressão: Integração de um rede vascular, uma vez que as células necessitam estar perto de um vaso sanguíneo. Também, a integridade mecânica é geralmente fraca devido a composição do meio de cultura onde as células estão imersas ser baseado em água. Ainda, fazer com que as células se agreguem é uma tarefa não trivial. Para muitos tecidos, é necessário com que se consiga atingir altas densidades de célula, fazendo com que se tenha um alto contato de célula com célula. Em contrapartida, é necessário que se escolha com muito cuidado os parâmetros bem como pressão e temperatura para que as células não fiquem danificadas após passarem pelo processo. Por fim, para que se possa fabricar

um órgão ou tecido é necessária muita “matéria-prima”, que não é de fácil obtenção. Logo, a preparação de grandes quantidades de material é um empecilho.

Cada máquina, ferramenta e método é capaz de superar algumas dificuldades dessas citadas. Contudo, ainda não há um método que consegue superar todas as adversidades encontradas. Esse artigo tem como objetivo trazer algumas técnicas utilizadas como solução atualmente e também trazer um breve pensamento sobre o que essa tecnologia acarretaria na sociedade.

2 MÉTODOS E FERRAMENTAS

2.1. Andaimos

Como dito anteriormente, a integridade estrutural é um contratempo comum devido à natureza do material que é trabalhado. Os andaimos são estruturas usadas na engenharia de tecidos que dão suporte e guiam as células. A porosidade da estrutura permite com que as células se instalem não somente na periferia dele. Também, é responsabilidade dele orientar a proliferação das células para obter a forma desejada e promover a especialização das células para o fenótipo desejado.

Contudo, o potencial dos andaimos pode ser superestimado [4]. As principais dificuldades para essa abordagem são: A vascularização de tecidos espessos, alcance de densidades altas de célula, dificuldade no posicionamento para geometrias 3D complexas e pouca interação célula-célula, necessário para alguns tecidos como o tecido do miocárdio por exemplo. Os andaimos podem ser construídos em dois tipos de material: Os materiais baseados em hidrogel e os materiais baseados em fibras poliméricas obtidas por eletrofiação. Cada um deles com propriedades interessantes.

Os andaimos baseados em hidrogel possuem o clássico problema da integridade mecânica. Contudo, são mais capazes de replicar as condições reais encontradas no meio extracelular do corpo humano. São recomendados para tecidos moles, uma vez que podem reter grande quantidade de água e possuem maior biocompatibilidade. Já os tecidos de fibras poliméricas são mais resistentes do ponto de vista mecânico, mas não possuem compatibilidade

tão alta. São recomendados para tecidos onde a integridade mecânica é crucial. Sabendo disso, pesquisadores tentam usar compósitos para tentar unir as melhores características de cada um.

2.2. Impressão a laser

Na impressão a laser, um meio de cultura de células é preparado numa placa denominada placa doadora. A placa doadora é montada de cabeça para baixo no suporte. Então, um feixe de laser cria uma bolha, gerando ondas de choque, fazendo com que as células da placa doadora se desprendam e migrem para a placa coletora. É possível realizar uma montagem na placa doadora com diferentes tipos de células, bem como uma palheta, e imprimir diferentes células no mesmo tecido com uma grande precisão. A precisão pode ser aumentada melhorando os parâmetros do processo como por exemplo viscosidade.

Quanto aos parâmetros, foi visto que uma concentração de alginato de sódio de 0,5-1% pode ser utilizada para aumentar a viscosidade. Em geral, uma “biotinta” (combinação de hidrogel e células) com viscosidade mais alta tende a aumentar a taxa de sobrevivência das células. Quanto a energia, no caso desse experimento variando de 8J a 24J, não mostrou mudança significativa no processo, exceto quando a camada de células na placa doadora não é espessa o bastante [8]. A eficiência de transferência de células pode chegar a 90% (desconsiderando as perdas de célula nas bordas da placa) [5].

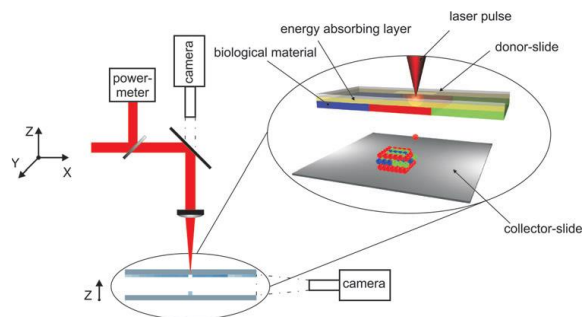


Figura 1 – Impressora a laser [5]

2.3. Impressão por jato

A impressão a jato usa gotículas de “biotinta” (combinação de hidrogel e células). Essas pequenas gotas são expelidas da impressora (possivelmente num andaime), formando camadas de célula do tecido. Geralmente, a biotinta é armazenada num cartucho montado num braço

robótico que se movimenta em todos os graus de liberdade. Assim, um sistema de pressão faz com que a biotinta saia através de um bico estreito, formando gotículas. Uma bioimpressora pode utilizar vários cartuchos contendo células diferentes, bem como vários braços visando aumentar a velocidade do processo [6].

Devido ao fato das células serem pressionadas por uma abertura estreita, elas podem ser danificadas durante a impressão. A escolha errada de parâmetros como alta pressão, bico com diâmetro muito estreito e viscosidade muito elevada pode resultar numa grande tensão de cisalhamento, que irá comprometer a integridade da parede celular e assim inutilizar a célula.

Este tipo é o mais difundido de impressora 3D. Já foram fabricadas estruturas cartilaginosas, auxiliadas pelo emprego de andaimes [7]. Também, já foi trabalhado um ovário de hamster chinês [8]. A eficiência do processo é 90%, ou seja, 90% das células chegam vivas e com plenas capacidades após o processo.

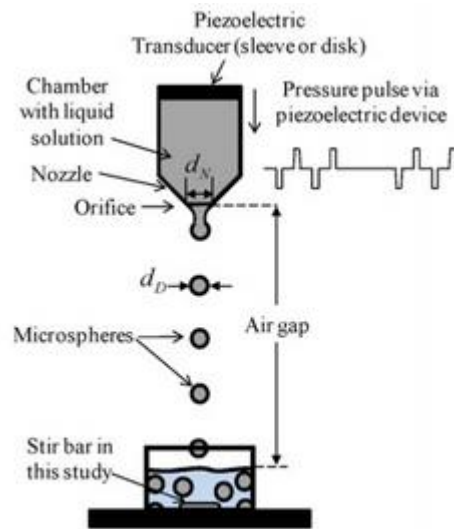


Figura 2 – Impressora por jato [9]

2.4. Impressão por extrusão

A extrusão de filamentos de biomaterial é denominada Impressão por extrusão. Um sistema automatizado com pressão libera o fluido e um braço robótico movimenta a cabeça do sistema para imprimir filamentos cilíndricos e assim, formar a estrutura. Assim como na impressão por jato, alta pressão e viscosidade podem levar a uma alta tensão cisalhante, podendo assim inviabilizar o uso da célula. O fluxo com que se expelle o fluido também é um parâmetro importante para esse processo.

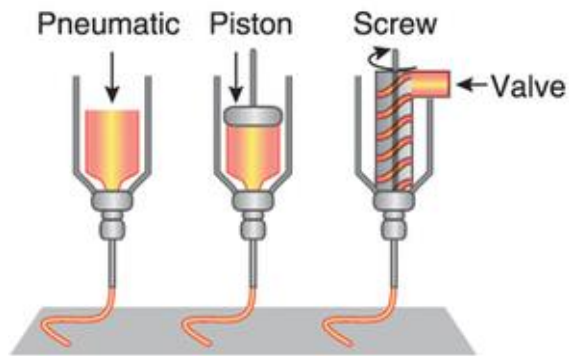


Figura 1 – Impressão por extrusão [10]

A impressão por extrusão, assim como as outras duas técnicas, pode ou não ter o uso de andaimes. Na abordagem sem andaimes, agregados ou varas de células são impressos em formas geométricas ou não, e são deixados para se fundir e adquirir o formato desejado. O pequeno diâmetro de 90 μm já conseguiu ser alcançado utilizando para a construção varas como blocos de construção [2].

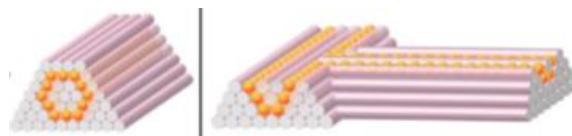


Figura 2 – Vasos capilares construídos [2]

3 DISCUSSÃO DAS FERRAMENTAS

O equipamento que se utiliza do laser tem a maior precisão dentre todos os processos e por conseguinte, permite um padrão de tecidos mais complexo. Mas com certeza, a crucial vantagem da impressão do laser em relação aos outros dois métodos é a ausência de um bico. Isso permite a utilização de uma viscosidade muito mais alta sem provocar tensão cisalhante nas células e portanto inviabilizar o uso da célula. Em relação as desvantagens, o tempo de fabricação é alto e o maquinário é o mais caro de todos. Também, o laser pode causar deformação térmica e mecânica nas células, proveniente das ondas de choque. Ainda, há outros

problemas relacionados principalmente a parte biológica. Contudo, devido ao processo ser o mais recente, especialistas afirmam que as dificuldades serão contornadas [11]. Ainda, os parâmetros da impressão a laser não foram completamente aprimorados, bem como viscosidade e tensão superficial por exemplo. Em adição, outra desvantagem do método é a dificuldade do agrupamento das células depois de impressas, uma vez que células únicas são impressas uma de cada vez. Outro problema é que atualmente o display é de uma placa doadora em cima, só permitindo a liberação de células por cima, o que dificulta geometrias 3D mais complexas (quando imprimindo ao redor de um andaime por exemplo). Contudo, um braço robótico se movendo em todos os graus de liberdade poderia superar esse entrave. Por fim, um problema é a preparação da placa coletora requer muito cuidado, em que a camada de células deve ser uniforme para que a liberação de células seja consistente.

A impressão por jato é o processo mais barato e mais versátil. O sistema permite a inclusão de múltiplos braços com cartucho, aumentando assim a produtividade e possibilitando utilizar diferentes tipos de célula em cada cartucho. É possível adquirir uma impressora inkjet convencional e adaptar para ser utilizada como impressora 3D. No entanto, o bico e a alta concentração celular (cerca de 5000 células/ml) resulta em danificação e morte de algumas células. Ainda, fundir as células unitárias impressas é uma dificuldade assim como no processo a laser e a integridade mecânica é fraca por serem gotas soltas. A precisão desse método não é tão boa quanto na impressão a laser.

A impressão por extrusão é rápida, barata e possui vantagem em relação a união dos pedaços impressos em relação as outras duas técnicas. Possui o problema na tensão cisalhante quando a densidade celular é alta devido ao bico, mas que pode ser otimizado com uma boa escolha de parâmetros. A falta de versatilidade nos tipos de célula que o processo permite e a baixa precisão limitam a aplicabilidade do método. A dilema do processo é a escolha da viscosidade do material, pois é necessário haver viscosidade suficiente para romper a tensão superficial e fazer os filamentos, mas também queremos a menor viscosidade possível para não comprometer a célula [12].

Como observado, a aglutinação das células é um problema frequente na bioimpressão. Por isso, faz-se o uso de pequenos fragmentos de tecido pré-fabricados [12]. Esses esferoides, como são chamados, são aglomerados de milhares de células, usados como blocos na impressão 3D.

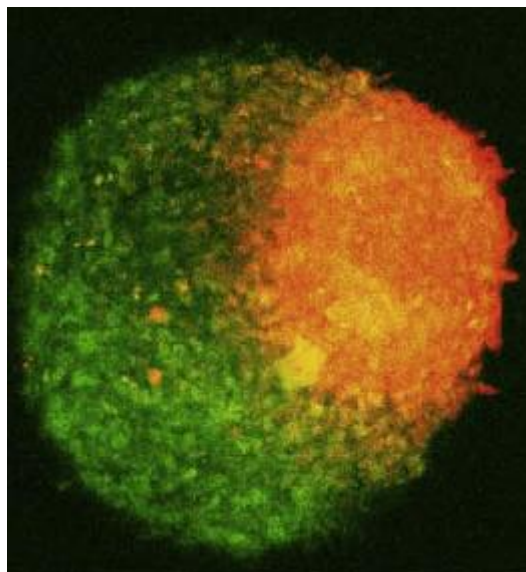


Figura 3 – Esferoide [12]

O uso desses esferoides tem tido muitos avanços pois muitas das células já estão juntas, ou seja, o número de junções fica muito menor. Por consequência disso, o tempo de maturação do tecido reduz drasticamente. Ainda, altas densidades e taxas de contato célula-célula podem ser atingidas, permitindo uma ampla gama de tecidos possíveis. Também, devido ao fato de muitas células estarem dentro desses blocos, elas não sofrem tensão cisalhante, ou seja, o emprego de blocos ainda aumenta a taxa de sobrevivência das células nos processos de impressão. Contudo, como pontos negativos, a produção desses esferoides custam tempo e dinheiro elevados. Também, devido ao fato de que eles possuem um tamanho considerável (0,5 milímetros), a resolução da impressão não é alta, inviabilizando alguns tecidos que precisam de maior resolução no seu padrão de células.

4 REFLEXÕES E CONCLUSÃO

Esse artigo até agora trouxe algumas ferramentas e técnicas, trazendo assim o atual estado de arte da bioimpressão 3D. No entanto, ainda não foi discutido o que essa tecnologia, se aprimorada para uso em pacientes, acarretaria na sociedade. O debate moral inerente ao assunto é muito delicado e pertinente, e é inevitável a sua menção neste trabalho.

Acredita-se que a consolidação das técnicas relativas a impressão de órgãos artificiais seria algo revolucionário. Idealmente, isso implicaria no fim de filas de espera para transplante de órgãos, desenvolvimento da medicina e aumento significativo da expectativa de vida humana mundial.

Entretanto, associados a esses impressionantes benefícios estão sérias consequências. A mais visível de todas seria a superpopulação do planeta. Devido ao fato de que muitos órgãos humanos seriam virtualmente substituíveis com essa tecnologia, doenças e enfermidades em geral tornar-se-iam menos graves do ponto de vista da medicina. Com isso, cada vez menos pessoas faleceriam por causas naturais. A população cresceria anormalmente, talvez causando escassez de recursos e conflitos sociais a longo prazo.

Outra seria a elitização da saúde. Há a crença de que, devido a lei da oferta e procura, tais serviços de manutenção da vida humana possivelmente se tornariam caros de modo exorbitante, e apenas uma pequena parcela extremamente rica da população teria acesso. Assim, a nova tecnologia não estaria apta a beneficiar a maioria da sociedade.

Do ponto de vista ético, a produção e utilização arbitrárias de órgãos humanos pode gerar grandes controvérsias. Assim como o uso de células-tronco, a bioimpressão é um assunto muito complicado moralmente. Essa discussão poderia facilmente ser tema exclusivo de um novo artigo científico, e é um ótimo exemplo de interação entre desenvolvimento de tecnologia e sociedade.

Enfim, vários outros importantes impactos podem ser imagináveis, sendo eles positivos e negativos. Previsões a respeito do tema chegam a adentrar na área da ficção científica, e devem considerar toda a complexidade envolvida na reprodução de tecidos humanos artificialmente. De qualquer forma, é inegável a relevância dessa tecnologia para a humanidade.

REFERÊNCIAS

- [1] [Online]. **Quantos órgãos acabariam com a fila de transplantes no Brasil?** Disponível em: <<http://super.abril.com.br/ciencia/quantos-orgaos-acabariam-com-a-fila-de-transplantes-no-brasil>>. Acesso em 15 de maio de 2016.
- [2] NOROTTE, C., MARGA, F. S., NIKLASON, L. E., & FORGACS, G. **Scaffold free vascular tissue engineering using bioprinting**. Biomaterials, 2009.
- [3] FERRIS, C. J., GILMORE, K. G., WALLACE, G. G., & IN HET PANHUIS, M. **Biofabrication: an overview of the approaches used for printing of living cells**, 2013.
- [4] WILLIAMS DF. **On the mechanisms of biocompatibility**. Biomaterials, 29:2941–53, 2008.

- [5] KOCH, L., KUHN, S., SORG, H., GRUENE, M., SCHLIE, S., GAEBEL, R., CHICHKOV, B. **Laser printing of skin cells and human stem cells**. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 16(5), 847–854, 2010.
- [6] S. KHALIL, F. NAM, AND W. SUN, **Multi-nozzle deposition for construction of 3-D biopolymer tissue scaffolds**, *Rapid Prototyping J.*, vol. 11, pp. 9–17, 2005.
- [7] CUI, X., BREITENKAMP, K., FINN, M. G., LOTZ, M., & D’LIMA, D. D. **Direct Human Cartilage Repair Using Three-Dimensional Bioprinting Technology**. *Tissue Engineering Part A*, 18(11-12), 1304–1312, 2012.
- [8] XU, T., JIN, J., GREGORY, C., HICKMAN, J. J., & BOLAND, T. **Inkjet printing of viable mammalian cells**. *Biomaterials*, 26(1), 93–99, 2005.
- [9] HERRAN, C. L., & HUANG, Y. **Alginate microsphere fabrication using bipolar wave-based drop-on-demand jetting**. *Journal of Manufacturing Processes*, 14(2), 98–106, 2012.
- [10] [Online] **Engineering Scaffolds**. *JOM*. 2013;65(4):505-16. Disponível em: <http://www.nature.com/nbt/journal/v32/n8/fig_tab/nbt.2958_F2.html>. Acesso em 20 de setembro de 2015.
- [11] OZBOLAT, I. T., & YU, Y. **Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends**, 60(3), 691–699, 2013.
- [12] MIRONOV, V., VISCONTI, R. P., KASYANOV, V., FORGACS, G., DRAKE, C. J., & MARKWALD, R. R. **Organ printing: Tissue spheroids as building blocks**. *Biomaterials*, 30(12), 2164–2174, 2009.