

IMPRESSÃO 4D DE MATRIZ EXTRACELULAR: PROJETO PILOTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE TECIDOS COMPLEXOS

4D printing of extracellular matrix: pilot project for the development of complex tissues

Heloisa Moreira Feijó¹, Mariana Lima de Moraes Inocêncio¹, Laiz Correia Arruda¹, Vitor Benedito Ferreira Freire¹, Edilson Eugênio da Silva², Frederico Duarte de Menezes², Jacek Stanislaw Michewicz², José Ângelo Peixoto da Costa², Luciana Lima Monteiro², Clessio Leão Silva Lima³, João Victor Barreto Ipiranga³, Amaury de Siqueira Medeiros Filho⁴, Jorge Eduardo Oliveira Filho⁴, Amanda Vasconcelos de Albuquerque¹, Leonardo Lima Monteiro^{1*}

1. Faculdade de Medicina de Olinda (FMO) 2. Instituto Federal de Pernambuco (IFPE) 3. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) 4. 3D Bladder Printing Workgroup * Autor correspondente

Recebido: 01.junho.2022 | Aprovado: 25.agosto.2022

RESUMO

Introdução: A indisponibilidade de órgãos e tecidos para transplante com o objetivo de atender a demanda existente é um dos grandes desafios na área médica. Uma solução viável para essa problemática é a impressão tridimensional (3D) de órgãos e tecidos. O presente estudo apresenta resultados preliminares dos primeiros modelos da matriz extracelular (MEC) 4D utilizando um biomaterial.

Métodos: Estudo experimental, multicêntrico, realizado no laboratório de Simulação e Fabricação Digital (SIMUFAB) do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE). Uma solução de alginato de sódio a 2% foi utilizada para a fabricação da MEC em uma impressora 3D Zmorph do tipo FDM.

Resultados: A figura geométrica da MEC foi um quadrado com 1cm² de área desenvolvida pelo software Voxelizer, projetado inicialmente no CAD (*computer aided design*). A seguir, o biomaterial em forma de gel foi impresso com uma velocidade de extrusão de 1mm/s e uma velocidade de impressão de 3mm/s. Obtivemos êxito na impressão com o biopolímero selecionado para a fabricação da MEC. Verificou-se um depósito uniforme do material durante a impressão, permitindo obter a forma geométrica projetada no CAD.

Discussão: O presente artigo mostra resultados preliminares do processo de impressão de uma MEC 4D. O êxito da impressão da MEC qualifica alginato como um dos principais biopolímeros a ser utilizado nas futuras fases desse estudo.

Conclusão: A variação da área da ponteira e a velocidade de extrusão têm grande influência na análise dos parâmetros finais para utilizar a impressora 3D.

Descritores: Bioimpressão, Matriz Extracelular, Medicina Regenerativa, Bioengenharia, Tecidos Suporte.

ABSTRACT

Introduction: The shortage of organs and tissues for transplantation to meet the existing demand is one of the great challenges in the medical field. A feasible solution to this problem is the three-dimensional (3D) printing of organs and tissues. The present study presents preliminary results of the first 4D extracellular matrix (ECM) models using a biomaterial.

Methods: Experimental, multicenter study carried out at the Simulation and Digital Fabrication Laboratory (SIMUFAB) of the Federal Institute of Pernambuco (IFPE). A 2% sodium alginate



solution was used to manufacture the MEC on a Zmorph 3D printer, type FDM.

Results: The MEC geometric figure was a square with an area of 1cm² and developed by the Voxelizer software, initially designed in CAD (computer aided design). Next, the biomaterial in gel form was printed with an extrusion speed of 1mm/s and a printing speed of 3mm/s. We succeed in the printing with the biopolymer selected for the manufacture of MEC. There was a uniform deposit of the material during printing, which allowed obtaining the geometric shape designed in CAD.

Discussion: This article shows preliminary results of the printing process of a 4D MEC. The achievement of the MEC impression qualifies alginate as one of the main biopolymers to be used in the future phases of this study.

Conclusion: The variation of the nozzle area and the extrusion speed have a great influence on the analysis of the final parameters to use the 3D printer.

Keywords: Bioprinting, Extracellular Matrix, Regenerative Medicine, Bioengineering, Scaffolds.

INTRODUÇÃO

A falta de órgãos para transplante é um grande obstáculo enfrentado por pacientes e cirurgiões. É previsto que a necessidade de transplante de órgãos na população aumente à medida que a expectativa de vida e a incidência de doenças crônicas aumentem.¹ Aproximadamente, seis milhões de pessoas estão com falência de órgãos em estágio final no mundo.² Nos EUA, aproximadamente 40.000 pacientes recebem um transplante de órgão a cada ano. No entanto, 120.000 pacientes permanecem em lista de espera, dentre os quais, 7.600 indivíduos vão a óbito anualmente enquanto aguardam um transplante. Na Europa, assim como em outros países, os pacientes são afetados por uma semelhante escassez de órgãos com altas taxas de mortalidade enquanto estão na lista de espera para transplante. Durante a pandemia de COVID-19, esses índices deterioraram. Ademais, verificou-se uma forte associação temporal entre o aumento das infecções por COVID-19 e uma significativa redução nos procedimentos gerais de transplante de órgãos sólidos. A redução geral de transplantes de doadores falecidos foi de 90,6% na França e 51,1% nos EUA. Além disso, houve uma diminuição da captação de órgãos, assim como uma redução significativa nas taxas de transplante mesmo em regiões onde os casos de COVID-19 são escassos, sugerindo um efeito global além do local.³

O Brasil, seguindo a tendência mundial,

tem enfrentado um processo de envelhecimento populacional. O crescimento no número de idosos, assim como o número de pacientes com quadro clínico de falência de órgão amplia a necessidade de transplantes.⁴

As tecnologias inspiradas na medicina regenerativa desafiam a eficácia do atual modelo de transplante de aloenxerto. Uma solução viável para essa problemática é a impressão tridimensional (3D) de órgãos e tecidos. Associada à engenharia de tecidos, a medicina regenerativa não apenas abre novos caminhos para substituir e regenerar tecidos e órgãos, como também pode ter o potencial de corrigir alguns defeitos congênitos por meio de órgãos e tecidos cultivados em laboratório, os chamados órgãos bioartificiais.⁵ Uma revisão sistemática publicada recentemente mostrou que a impressão 3D tem potenciais revolucionários no aconselhamento de pacientes, planejamento cirúrgico pré-operatório, intraoperatório e educação em urologia. Embora os custos e os tempos de produção continuem sendo os principais desafios, o uso dessa tecnologia pode representar um passo à frente para atender à demanda dos pacientes e cirurgiões.⁶

A medicina regenerativa é uma área ainda experimental, mas que já produziu alguns resultados relevantes, como por exemplo, os estudos do médico e pesquisador Anthony Atala, referência mundial no desenvolvimento de impressão 3D de material biológico. Um dos seus estudos sobre a produção de bexiga

em laboratório originou um tecido biocompatível que substituiu a órgão total ou parcialmente, no entanto, sem a capacidade funcional de contração. O implante total foi bem-sucedido e melhorou consideravelmente a qualidade de vida do paciente.⁷ O supracitado pesquisador é responsável por diversos outros estudos em medicina regenerativa utilizando a impressão 3D, tais como a fabricação do miocárdio endotelizado humano a partir de células troncos em uma matriz extracelular microfluídica.⁸

A impressão 3D permite a fabricação de formas complexas com alta precisão, através da adição de camada por camada de material. A utilização de diferentes materiais inteligentes, ou seja, que mudam de forma, cor ou produzem corrente elétrica em resposta a um estímulo externo tornando-os bioativos ou desempenhando uma função pretendida, de modo a abrir o caminho para a produção de estruturas 3D dinâmicas, que atualmente é chamada de impressão 4D.⁹

Basicamente *in vivo*, os tecidos são estruturas dinâmicas constituídas por vários tipos de células, uma matriz extracelular (MEC) e uma variedade de moléculas de sinalização.

A MEC é um componente crucial do microambiente celular e forma uma rede tridimensional complexa.¹⁰ Na impressão 3D, quando adicionadas a MEC, as células podem ser organizadas em estruturas complexas originando tecidos ou órgãos.¹¹

Atualmente a medicina regenerativa visa o desenvolvimento de uma técnica de impressão 4D de material biológico que possa, futuramente, ser implantada no corpo humano de

modo a substituir um tecido ou órgão e que seja biologicamente compatível diminuindo os riscos de rejeição. O objetivo do presente estudo é fabricar matrizes 4D (*scaffold*) em uma impressora 3D à base de alginato visando a adição de células, que posteriormente originarão tecidos e órgãos, objetivando posterior aplicação na medicina regenerativa em animais e, finalmente, em seres humanos.

Atualmente, está sendo iniciada a fabricação das MEC no laboratório de Simulação e Fabricação Digital (SIMUFAB) - Centro de Pesquisa do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE) - Campus Recife. Desse modo, o presente artigo visa apresentar resultados preliminares do processo de impressão das MEC, o que inclui, treinamento para operação de impressoras, bem como a fabricação mecânica.

MÉTODOS

Estudo experimental, multicêntrico envolvendo a Faculdade de Medicina de Olinda (FMO), o Instituto Federal de Pernambuco (IFPE) e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foi realizada uma extensiva revisão da literatura com o objetivo de definir o biomaterial, a impressora, a ponteira de extrusão adaptado para biotintas, o *software*, a figura geométrica e a técnica de impressão para a fabricação da MEC.

O biomaterial selecionado para a realização dos primeiros testes foi o alginato de sódio (figura 1). Este é definido como uma classe de biopolímeros, derivados inicialmente da parede celular de algas marrons de diferentes espécies tais como *Laminaria*, *Macrocystis*, *Sargassum*, dentre outras.^{12, 13}

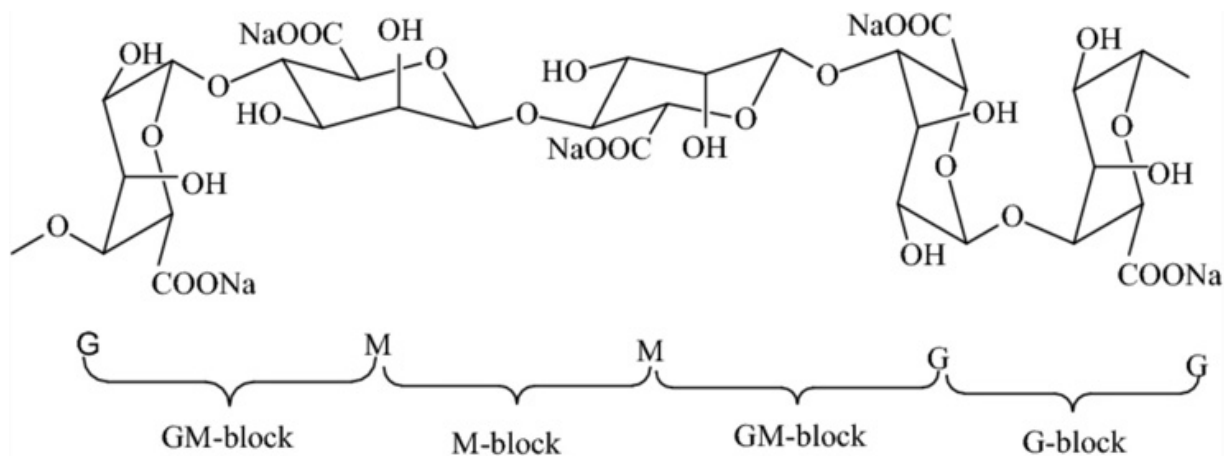


Figura 1. Diferentes blocos de alginato ligados com 1 → 4 ligações glicosídicas

ARTIGO

Para a fabricação da MEC, produzimos um gel do biomaterial da seguinte forma, preparamos uma solução contendo alginato de sódio a 2% e cloreto de sódio a 0.25% diluídos em água. Em seguida, sob agitação mecânica e aquecimento a 80°C, adicionamos cloreto de cálcio a 0.25% numa proporção de 1 para 5 em ml, respectivamente.

Optamos pela impressora 3D Zmorph, tipo FDM (*fused deposition modeling*). O *software* selecionado para realizar os primeiros testes foi o Voxelizer, versão 2.0 de 2019, cuja função é converter o arquivo CAD (*computer aided design*) para o formato GCODE, que é a linguagem empregada para descrever como a impressora 3D deve imprimir um trabalho. Uti-

lizamos a ponteira de extrusão de pasta Zmorph, de 4mm, em alumínio, com uma velocidade de trabalho de 5ml/s em formato linear construindo um quadrado de 1cm² de área. Preliminarmente, utilizamos o poliácido láctico (PLA) e a celulose para definição dos parâmetros da impressora.

RESULTADOS

Os resultados preliminares do processo de impressão das MEC incluem o treinamento para operação de impressoras e a fabricação mecânica. Inicialmente, a estrutura da MEC foi projetada no CAD (figura 2) e através do *software* Voxelizer a impressora recebeu os comandos para executar o trabalho (figura 3).

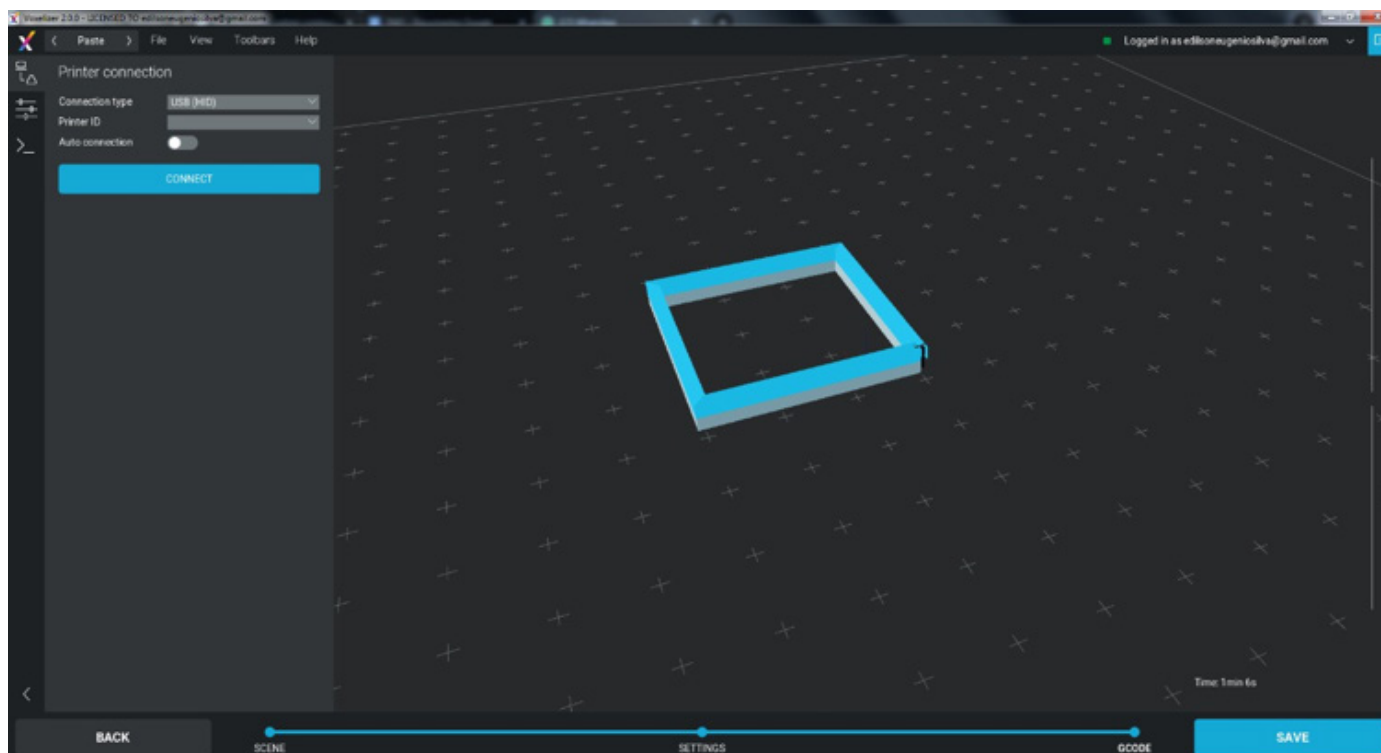


Figura 2. Estrutura da MEC



Figura 3. Impressora 3D Zmorph, tipo FDM iniciando o processo de fabricação da MEC

Para a análise experimental da impressão da MEC, foram realizados 5 testes utilizando poliácido láctico, celulose e alginato de sódio para a configuração de parâmetros de impressão, os quais incluíram a velocidade de extrusão e a velocidade de impressão.

- 1) Poliácido láctico (PLA). Utilizamos uma ponteira de extrusão com 0,4 mm² área, velocidade de extrusão de 40mm/s e velocidade de impressão de 40mm/s. Obtivemos êxito na impressão, ou seja, conseguimos a figura geométrica que se espera alcançar com o uso do biopolímero (figura 4).
- 2) Celulose. Utilizamos uma ponteira de extrusão adaptada para biotintas com uma área de 13,2 mm², velocidade de extrusão de 7mm/s e velocidade de impressão de 10mm/s. Durante a realização do teste, observamos que o valor de extrusão associado ao valor da velocidade de deposição aplicados ao material foi muito alto e não foi possível a impressão da MEC.
- 3) Alginato de sódio. Utilizamos uma seringa com bico de 35,7 e 4,0mm diâmetros, respectivamente, velocidade de extrusão de 1,5mm/s e velocidade de impressão de 1mm/s. Houve uma alta deposição de material em apenas um polo, não conseguimos a figura geométrica projetada no CAD.
- 4) Alginato de sódio. Empregamos uma seringa com as mesmas características do teste anterior, velocidade de extrusão 1mm/s e velocidade de impressão de 0,5mm/s. Semelhante ao teste anterior, ocorreu uma alta deposição do material em apenas um polo não permitindo obter a figura geométrica projetada no CAD.
- 5) Alginato de sódio. Empregamos uma seringa com as mesmas características do teste 3, velocidade de extrusão de 1mm/s e velocidade de impressão de 3mm/s. Obtivemos êxito na impressão com o biopolímero selecionado para a fabricação da MEC. Verificou-se um depósito uniforme do material durante a impressão, permitindo obter a figura geométrica projetada no CAD (figura 5).

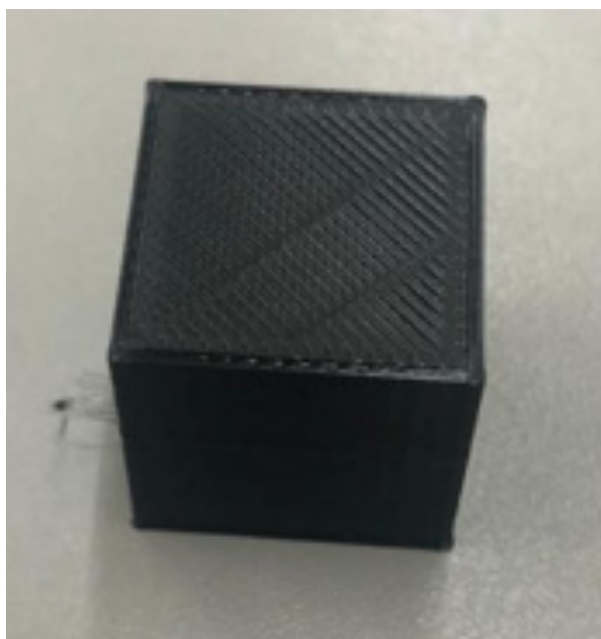


Figura 4. Imagem do modelo impresso com PLA

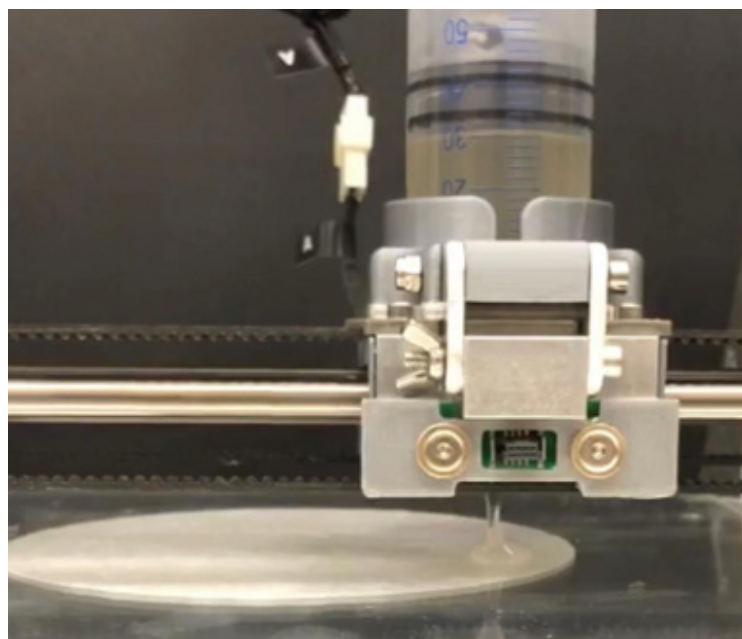


Figura 5. Imagem do modelo impresso com alginato de sódio

DISCUSSÃO

A indisponibilidade de órgãos e tecidos para transplante com o objetivo de atender a demanda existente é um dos grandes desafios na área médica. Além disso, a pandemia de COVID-19 afetou negativamente os índices de transplantes órgãos no mundo. Houve uma

diminuição no número de procedimentos realizados, de doadores de órgãos, além de um aumento na mortalidade dos pacientes em lista de espera por um órgão.^{3, 14} Nesse cenário permanente de falta de órgãos para transplante, exacerbado pelo contexto atual de pandemia, faz-se necessário buscar terapêuticas inovado-

ARTIGO

ras. Nesse contexto, a medicina regenerativa exerce um papel de destaque por ser um método inovador para substituir ou restaurar células, tecidos e órgãos do corpo humano. A fabricação da MEC é um dos pilares da medicina regenerativa, entretanto, representa um dos obstáculos tecnológicos para a produção de tecidos. Criar um ambiente com condições semelhantes à matriz extracelular de um ser humano, no qual as células possam se fixar e manter a seu metabolismo adequado, é complexo. As MEC são estruturas de materiais sintéticos ou naturais sobre os quais novos tecidos podem ser cultivados para substituir o tecido danificado.¹⁵

O presente artigo mostra resultados preliminares do processo de impressão 4D de uma MEC que incluiu desde o treinamento para utilizar a impressora até os primeiros testes de fabricação mecânica. Para o efeito, foram definidos os equipamentos a serem utilizados racionalizando os recursos existentes, uma vez que, a fabricação de MEC em impressoras 3D tem um custo elevado.¹⁶

O alginato foi o biopolímero selecionado para o presente estudo. O alginato é um dos biomateriais mais utilizados na engenharia biomédica devido a sua semelhança molecular com a dos polissacarídeos. Ademais, a facilidade de se obter géis, os quais incorporaram células-tronco e mimetizam um microambiente extracelular favorecendo a engenharia de tecidos e a pesquisa básica, justificam tal escolha.¹⁷

O primeiro teste foi realizado com o PLA, o qual dispõe de melhores características termomecânicas em relação ao gel de alginato. O PLA apresenta maior resistência mecânica e menor coeficiente de expansão térmica, o que melhora sua capacidade de impressão, reduzindo vieses durante o processo de fabricação.¹⁸ No teste 2, o valor da velocidade de extrusão associado ao valor da velocidade de deposição aplicados ao material foi excessivo e com isso inviabilizou a impressora de executar o trabalho. Desse modo, definiram-se parâmetros a serem utilizados na impressão utilizando o alginato. Ao adicionar no *software* os parâmetros obtidos anteriormente com os diferentes materiais, não foi possível fabricar a MAC de acordo com a figura geométrica projetada no CAD, teste 3 e 4. A

partir dos testes inaugurais com alginato, houve evidências de que diminuindo a velocidade de extrusão para 1mm/s e aumentando a velocidade de impressão para 3mm/s conseguir-se-ia fabricar a MAC conforme o projeto desenvolvido no CAD. Ao utilizar os parâmetros supracitados, verificou-se um depósito uniforme do material durante a impressão, permitindo obter a figura geométrica projetada no CAD.

Algumas limitações devem ser levadas em consideração no presente artigo, dentre elas a ausência de análises físico-químicas para uma matriz 4D e as dificuldades para estabilização do filamento extrudado de acordo com o material testado, as quais inviabilizaram a realização de análises estatísticas. Entretanto, esses são resultados preliminares com perspectivas de desenvolver um avanço na medicina regenerativa e na bioengenharia de tecidos.

CONCLUSÃO

A variação da área da ponteira e a velocidade de extrusão têm grande influência no resultado final da impressão da matriz 4D. A facilidade do manuseio e a acessibilidade do alginato foram observadas durante o processo de fabricação da MEC nesse estudo. O alginato provou ser de grande utilidade na engenharia de tecidos e seu potencial como biomaterial qualifica-o para futuros estudos visando a estabilização do filamento extrudado.

REFERÊNCIAS

1. Edgar L, Pu T, Porter B, Aziz JM, La Pointe C, Athana A, Orlando G. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *Br J Surg.* 2020 Jun;107(7):793-800. doi: 10.1002/bjs.11686. PMID: 32463143.
2. Levin A, Tonelli M, Bonventre J, Coresh J, Donner JA, Fogo AB, Fox CS, Gansevoort RT, Heerspink HJL, Jardine M, Kasiske B, Köttgen A, Kretzler M, Levey AS, Luyckx VA, Mehta R, Moe O, Obrador G, Panu N, Parikh CR, Perkovic V, Pollock C, Stenvinkel P, Tuttle KR, Wheeler DC, Eckardt KU; ISN Global Kidney Health Summit participants. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet.* 2017 Oct 21;390(10105):1888-1917. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30788-2. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28434650.

3. Loupy A, Aubert O, Reese PP, Bastien O, Bayer F, Jacquelinet C. Organ procurement and transplantation during the COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2020 May 23;395(10237):e95-e96. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31040-0. Epub 2020 May 11. PMID: 32407668; PMCID: PMC7213957.
4. Soares LSS, Brito ES, Magedanz L, et al. Transplantes de órgãos sólidos no Brasil: estudo descritivo sobre desigualdades na distribuição e acesso no território brasileiro, 2001-2017, *Epidemiol. Serv. Saúde* 29 (1) 2020. doi: 10.5123/S1679-49742020000100014.
5. Parihar A, Pandita V, Kumar A, Parihar DS, Puranik N, Bajpai T, Khan R. 3D Printing: Advancement in Biogenerative Engineering to Combat Shortage of Organs and Bioapplicable Materials. *Regen Eng Transl Med*. 2021 Jul 2:1-27. doi: 10.1007/s40883-021-00219-w. Epub ahead of print. PMID: 34230892; PMCID: PMC8252697.
6. Cacciamani GE, Okhunov Z, Meneses AD, Rodriguez-Socarras ME, Rivas JG, Porpiglia F, Liatsikos E, Veneziano D. Impact of Three-dimensional Printing in Urology: State of the Art and Future Perspectives. A Systematic Review by ESUT-YAUWP Group. *Eur Urol*. 2019 Aug;76(2):209-221. doi: 10.1016/j.eururo.2019.04.044. Epub 2019 May 18. PMID: 31109814.
7. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006 Apr 15;367(9518):1241-6. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68438-9. PMID: 16631879.
8. Zhang YS, Arneri A, Bersini S, Shin SR, Zhu K, Goli-Malekabadi Z, Aleman J, Colosi C, Busignani F, Dell'Erba V, Bishop C, Shupe T, Demarchi D, Moretti M, Rasponi M, Dokmeci MR, Atala A, Khademhosseini A. Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials*. 2016 Dec;110:45-59. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.003. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27710832; PMCID: PMC5198581.
9. El-Husseiny HM, Mady EA, Hamabe L, Abugomaa A, Shimada K, Yoshida T, Tanaka T, Yokoi A, Elbadawy M, Tanaka R. Smart/stimuli-responsive hydrogels: Cutting-edge platforms for tissue engineering and other biomedical applications. *Mater Today Bio*. 2021 Dec 9;13:100186. doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100186. PMID: 34917924; PMCID: PMC8669385.
10. Marchand M, Monnot C, Muller L, Germain S. Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2019 May;89:147-156. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.08.007. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30165150.
11. Soliman Y, Feibus AH, Baum N. 3D Printing and Its Urologic Applications. *Rev Urol*. 2015;17(1):20-4. PMID: 26028997; PMCID: PMC4444770.
12. Biswal T. Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Mater Today: Proc*. 2021 Mar;41(2):397-402. doi: 10.1016/j.matpr.2020.09.628.
13. Maity C, Das N. Alginate-Based Smart Materials and Their Application: Recent Advances and Perspectives. *Top Curr Chem (Cham)*. 2021 Nov 23;380(1):3. doi: 10.1007/s41061-021-00360-8. PMID: 34812965.
14. Boyarsky BJ, Werbel WA, Durand CM, Avery RK, Jackson KR, Kernodle AB, Snyder J, Hirose R, Massie IM, Garonzik-Wang JM, Segev DL, Massie AB. Early national and center-level changes to kidney transplantation in the United States during the COVID-19 epidemic. *Am J Transplant*. 2020 Nov;20(11):3131-3139. doi: 10.1111/ajt.16167. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32594606; PMCID: PMC7361931.
15. Diaz-Gomez L, Elizondo ME, Koons GL, Diba M, Chim LK, Cosgriff-Hernandez E, Melchiorri AJ, Mikos AG. Fiber engraving for bioink bioprinting within 3D printed tissue engineering scaffolds. *Bioprinting*. 2020 Jun;18:e00076. doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00076. Epub 2020 Jan 10. PMID: 33693067; PMCID: PMC7943183.
16. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Sep 1;78:1246-1262. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.017. Epub 2017 May 5. PMID: 28575964.
17. Nii T, Katayama Y. Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 12;22(16):8657. doi: 10.3390/ijms22168657. PMID: 34445363; PMCID: PMC8395440.
18. Santana L, Alves JL, Sabino Netto AC, Merlini C. A comparative study between PETG and PLA for 3D Printing through thermal, chemical and mechanical characterization. *Rev Mater*. 2018 Mar;23(04):e-12267