

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

4D printing of extracellular matrix: a pilot project of 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 é a impressão tridimensional de órgãos e tecidos. O presente estudo apresentou 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 do Instituto Federal de Pernambuco. Uma solução de alginato de sódio a 2% foi utilizada para a fabricação da MEC em uma impressora 3D Zmorph do tipo fused deposition modeling.

Resultados: A figura geométrica da MEC foi um quadrado com 1 cm² de área desenvolvida pelo software Voxelizer, projetado inicialmente no computer aided design. A seguir, o biomaterial em forma de gel foi impresso com uma velocidade de extrusão de 1 mm/s e uma velocidade de impressão de 3 mm/s. Obteve-se êxito na impressão. O depósito uniforme do material durante a impressão permitiu a obtenção da forma geométrica projetada.

Discussão: O presente estudo mostra resultados preliminares do processo de impressão de uma MEC 4D. O êxito da impressão qualifica o 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 na utilização da impressora tridimensional.

Palavras-chave: bioimpressão; matriz extracelular; medicina regenerativa; bioengenharia; tecidos suporte.

ABSTRACT

Introduction: The shortage of organs and tissues for transplant is a great challenge in the medical field. The 3D printing emerges as a feasible solution for this problem. This study presents preliminary results of the first models of a 4D extracellular matrix (ECM) using a biomaterial.

Methods: This experimental multicenter study was conducted at the laboratory of simulation and digital fabrication of the Federal Institute of Pernambuco. A solution of sodium alginate at 2% was used to print the ECM on a 3D printer model Zmorph type fused deposition modeling.

Results: The geometric figure used to print the ECM was a square with 1cm² of area initially planned in a computer aided design and developed using the Voxelizer software. The biomaterial in gel was successfully printed with extrusion speed of 1mm/s and printing speed of 3mm/s. The uniform deposit of the material during printing resulted in the geometric figure designed.

Discussion: This paper shows preliminary results of the printing of a 4D ECM. The sodium alginate might be a promising biopolymer to the future phases of this study.

Conclusion: The variation of the nozzle area and extrusion speed highly influences the analysis of the 3D printer final parameters.

Keywords: Bioprinting; extracellular matrix; regenerative medicine; bioengineering; scaffolds.

INTRODUÇÃO

A falta de órgãos para transplante é um grande obstáculo enfrentado por pacientes e cirurgiões. Cerca de seis milhões de pessoas estão com falência de órgãos em estágio final no mundo¹ e em diversos países pacientes são afetados por altas taxas de mortalidade enquanto estão na lista de espera para transplante. Nos EUA, aproximadamente 40.000 pacientes recebem um transplante de órgãos a cada ano. No entanto, 120.000 permanecem em lista de espera e 7.600 vão a óbito enquanto aguardam. Além disso, é previsto que o aumento da necessidade de transplante de órgãos na população seja proporcional ao da expectativa de vida e da incidência de doenças crônicas.²

A pandemia do COVID-19 agravou este cenário, desvelando uma forte associação temporal entre o aumento das infecções pelo coronavírus e uma significativa redução de transplante de órgãos sólidos. Na França e nos EUA, o índice de transplantes de doadores falecidos reduziu em 90,6% e 51,1%, respectivamente. Além disso, houve uma diminuição da captação de órgãos das taxas de transplante mesmo em regiões onde os casos de COVID-19 foram escassos, sugerindo um efeito global.³

No Brasil, o envelhecimento populacional segue a tendência mundial, que se soma ao aumento no número de pacientes com falência de órgãos e amplia a necessidade por 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, mas também pode corrigir defeitos congênitos utilizando órgãos e tecidos cultivados em laboratório, os chamados órgãos bioartificiais.⁵

Uma revisão sistemática evidenciou potenciais revolucionários da impressão 3D no aconselhamento de pacientes, no planejamento cirúrgico pré-operatório e intraoperatório e na 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

Apesar de experimental, a medicina regenerativa já produziu alguns resultados relevantes, como 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 o órgão total ou parcialmente, mas sem a capacidade funcional de contração. O implante total foi bem-sucedido e melhorou consideravelmente a qualidade de vida do paciente.⁷ Atala é responsável por diversos outros estudos em medicina regenera-

tiva utilizando a impressão 3D, como a fabricação do miocárdio endotelizado humano a partir de células troncos em uma matriz extracelular (MEC) microfluídica.⁸

A impressão 3D permite a fabricação de formas complexas com alta precisão por meio da adição de camadas de materiais inteligentes. Estes mudam de forma, cor ou produzem corrente elétrica em resposta a um estímulo externo, sendo bioativos ou desempenhando uma função pretendida, de modo a abrir o caminho para a produção de estruturas 3D dinâmicas (atualmente denominadas impressões 4D).⁹

Basicamente *in vivo*, os tecidos são estruturas dinâmicas constituídas por vários tipos de células, uma 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, as células adicionadas à MEC 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 diminuir os riscos de rejeição por ser biologicamente compatível.

O objetivo geral do estudo é fabricar matrizes 4D (*scaffold*) à base de alginato em

uma impressora 3D, visando a adição de células que posteriormente originarão tecidos e órgãos. Busca-se futura aplicação na medicina regenerativa em animais e, finalmente, em seres humanos.

As MEC foram fabricadas no laboratório de Simulação e Fabricação Digital do Centro de Pesquisa do Instituto Federal de Pernambuco - campus Recife. Desse modo, o presente estudo visou apresentar resultados preliminares do processo de impressão das MEC, que inclui o treinamento para operação de impressoras e a fabricação mecânica.

MÉTODOS

Estudo experimental multicêntrico envolvendo a Faculdade de Medicina de Olinda, o Instituto Federal de Pernambuco e a Universidade Federal de Pernambuco. Como passo inicial, foi realizada uma extensiva revisão da literatura para definição do biomaterial, impressora, ponteira de extrusão adaptado para biotintas, *software*, figura geométrica e técnica de impressão para a fabricação da MEC.

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

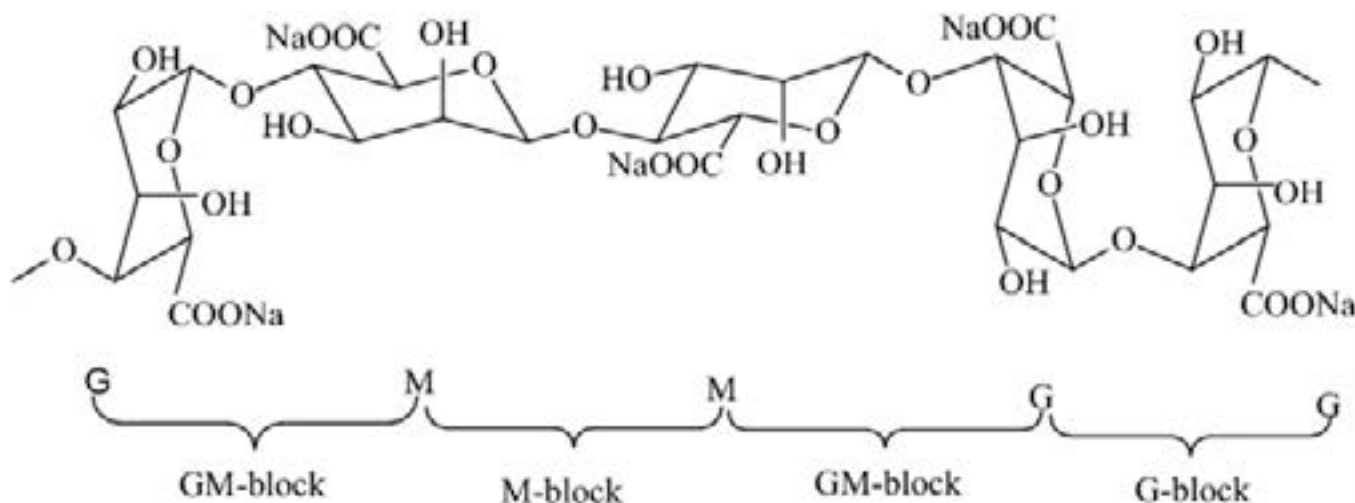


Figura 1. Diferentes blocos de alginato ligados com 1 → 4 ligações glicosídicas

Para a fabricação da MEC, foi produzido um gel do biomaterial composto por 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, foi adicionado cloreto de cálcio a 0,25% na proporção 1:5 em ml, respectivamente.

Optou-se pela impressora 3D Zmorph do tipo *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 *computer aided design* (CAD) para o formato GCODE, que é a linguagem empregada para descrever como a impressora 3D deve imprimir um trabalho. Utilizou-se

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

RESULTADOS

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

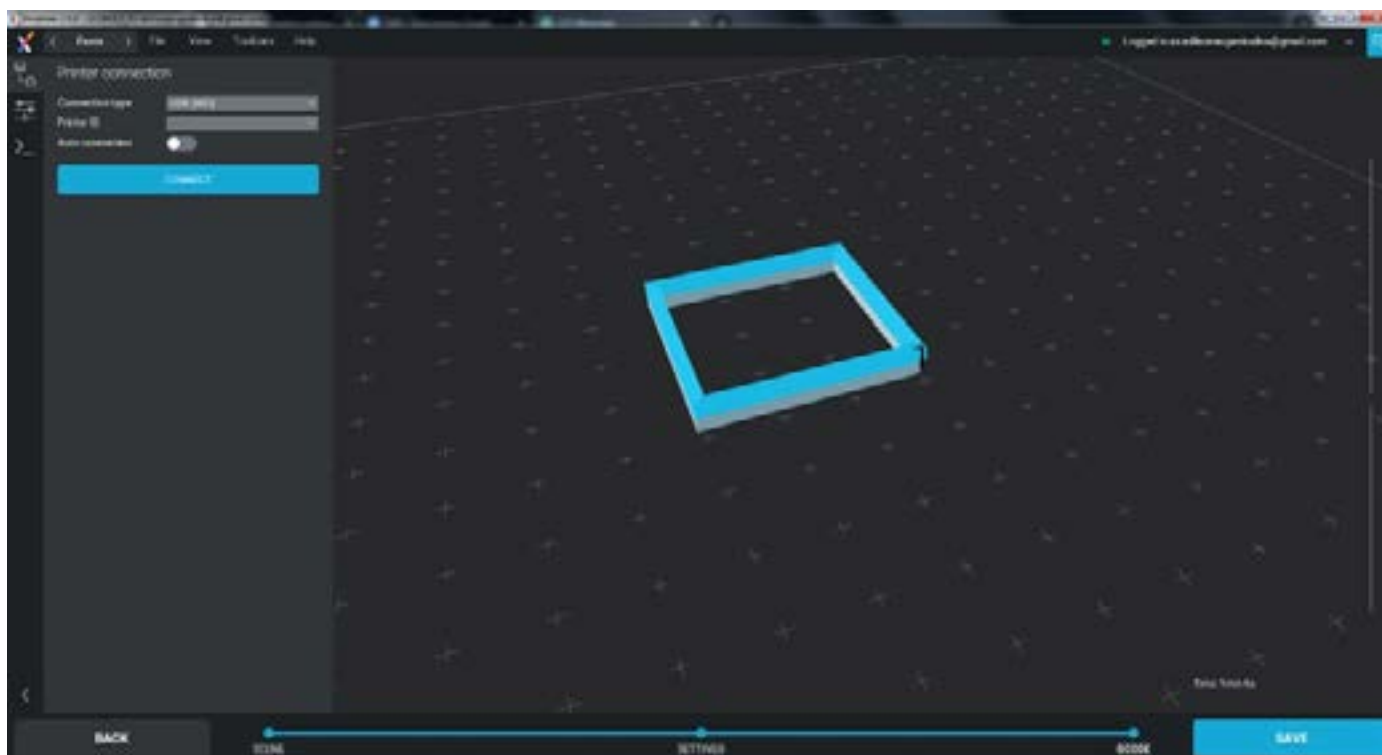


Figura 2. Estrutura da MEC



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

Para a análise experimental da impressão da MEC, foram realizados cinco testes com políácido láctico, celulose e alginato de sódio para a configuração de parâmetros de impressão, que incluíram as velocidades de extrusão e impressão, descritos a seguir:

- 1) PLA: utilizou-se uma ponteira de extrusão com uma área de $0,4 \text{ mm}^2$, velocidade de extrusão de 40 mm/s e velocidade de impressão de 40 mm/s . Obteve-se êxito na impressão da figura geométrica que se esperava alcançar com o uso do biopolímero (Figura 4).
- 2) Celulose: utilizou-se uma ponteira de extrusão adaptada para biotintas com uma área de $13,2 \text{ mm}^2$, velocidade de extrusão de 7 mm/s e velocidade de impressão de 10 mm/s . Durante a realização do teste, observou-se 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: utilizou-se uma seringa
- 4) Alginato de sódio: utilizou-se uma seringa com as mesmas características do teste anterior, velocidade de extrusão de 1 mm/s e velocidade de impressão de $0,5 \text{ mm/s}$. Semelhante ao teste anterior, ocorreu uma alta deposição do material em apenas um polo, não sendo alcançada a figura geométrica projetada no CAD.
- 5) Alginato de sódio: utilizou-se uma seringa com as mesmas características do teste 3, velocidade de extrusão de 1 mm/s e velocidade de impressão de 3 mm/s . Obteve-se êxito na impressão com o biopolímero selecionado para a fabricação das MEC. Verificou-se um depósito uniforme do material durante a impressão, permitindo-se obter a figura geométrica projetada no CAD (Figura 5).



Figura 4. Imagem do modelo impresso com políácido láctico.

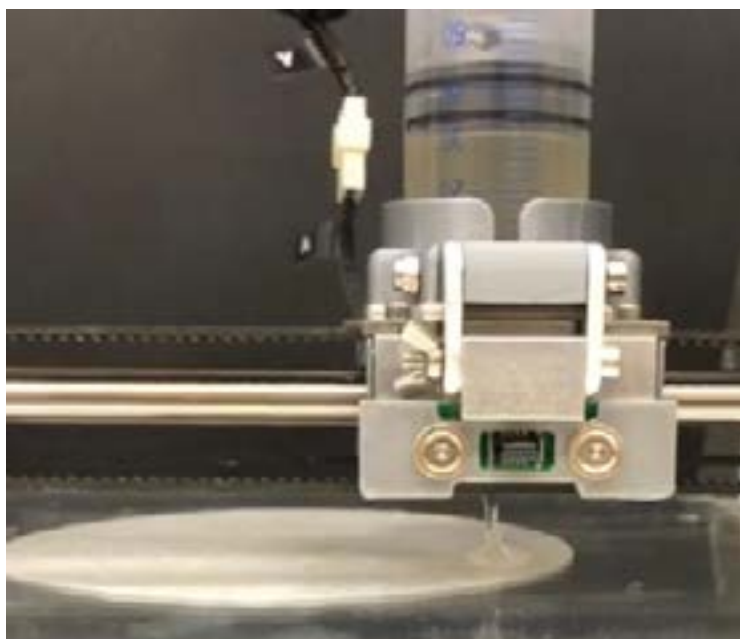


Figura 5. Imagem do modelo impresso com alginato de sódio

DISCUSSÃO

A indisponibilidade de órgãos e tecidos para transplante com o objetivo de atender à demanda existente é um dos grandes desafios na área médica. Além disso, a pandemia de COVID-19 afetou negativamente os índices de

transplantes de órgãos no mundo. Houve uma diminuição no número de procedimentos realizados e de doadores de órgãos, além de um aumento na mortalidade dos pacientes em lista de espera.^{3, 14}

No cenário permanente de falta de ór-

gãos para transplante, exacerbado pelo contexto pandêmico, tornou-se necessário buscar terapêuticas inovadoras. 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. Entretanto, a fabricação da MEC (um dos pilares da medicina regenerativa) representa um dos obstáculos tecnológicos para a produção de tecidos. As MEC são estruturas de materiais sintéticos ou naturais sobre os quais novos tecidos podem ser cultivados para substituir o tecido danificado.¹⁵ Criar um ambiente com condições semelhantes à MEC humana, no qual as células possam se fixar e manter seu metabolismo adequado, é complexo.

O presente estudo apresenta resultados preliminares do processo de impressão 4D de uma MEC que incluiu desde o treinamento na operação da impressora até os primeiros testes de fabricação mecânica. Para tanto, 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 por ser um dos biomateriais mais utilizados na engenharia biomédica devido à sua semelhança molecular com os polissacarídeos. Ainda, ele permite obter géis facilmente que incorporam células-tronco e mimetizam um microambiente extracelular, favorecendo a engenharia de tecidos e a pesquisa básica.¹⁷

O primeiro teste foi realizado com o PLA, que dispõe de melhores características termomecânicas em relação ao gel de alginato. Esse material 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, inviabilizando 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 mate-

riais, não foi possível fabricar a MEC de acordo com a figura geométrica projetada no CAD, como buscado nos testes 3 e 4. A partir deles, houve evidências de que diminuindo a velocidade de extrusão para 1mm/s e aumentando a velocidade de impressão para 3mm/s seria possível fabricar a MEC conforme o projeto desenvolvido no CAD. Ao se utilizar os parâmetros supracitados, verificou-se um depósito uniforme do material durante a impressão, permitindo-se obter a figura geométrica projetada no CAD.

Algumas limitações devem ser levadas em consideração, como a ausência de análises físico-químicas para uma matriz 4D e as dificuldades para estabilização do filamento extrudado de acordo com o material testado, que inviabilizaram a realização de análises estatísticas. Entretanto, esses são resultados preliminares com perspectivas de 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 da impressão da MEC 4D. A facilidade do manuseio e a acessibilidade do alginato foram observadas durante o processo de fabricação da MEC neste estudo. O alginato provou ser de grande utilidade na engenharia de tecidos e seu potencial como biomaterial o qualifica para futuros estudos visando a estabilização do filamento extrudado.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. 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.
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-Malekabi 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 microfibrillar 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