



Biofabricação e suas estratégias

**Janaína de Andréa Dernowsek, Rodrigo
Alvarenga Rezende,
Jorge Vicente Lopes da Silva**

Como citar esse texto: DERNOWSEK, J.A.; REZENDE, R.A.; DA SILVA, J.V.L. Biofabricação e suas estratégias. **VIRUS**, São Carlos, n. 11, 2015. [online] Disponível em: <<http://www.nomads.usp.br/virus/virus11/?sec=5&item=3&lang=pt#sect60>>. Acesso em: dd mm aaaa.

Janaina de Andrea Dernowsek é Doutora em Ciências Biológicas e pesquisadora na Divisão de tecnologias tridimensionais (DT3D) do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer. Atualmente pesquisa Bioimpressão 3D de tecidos e órgãos, modelagem tridimensional e simulações computacionais.

Rodrigo Alvarenga Rezende é Doutor em Engenharia Química, Pesquisador e Coordenador de Projetos na Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia Renato Archer. Atualmente trabalha com Tecnologia da Informação para a bioimpressão de tecidos e órgãos humanos.

Jorge Vicente Lopes da Silva é Doutor em Engenharia Química, Pesquisador e Coordenador de Projetos na Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia Renato Archer. Atualmente trabalha com desenvolvimento de software 3D, bioengenharia e biofabricação.

PALAVRAS-CHAVE

parametrização, V!11, biofabricação, fabricação digital.

Recentes avanços na manufatura aditiva têm permitido, ainda que em estágio preliminar, a impressão 3D de biomateriais e/ou células. A cada dia, o processo de biofabricação vem sendo adaptado para, no futuro, produzir diferentes tipos de tecidos humanos, em uma larga variedade de formatos e complexidades estruturais que possuam específicas propriedades biomecânicas como, por exemplo, características da vasculatura, visando à criação de biomodelos que mimetizem tecidos com parâmetros próximos dos reais. O grande desafio nessa área do conhecimento se dá no desenvolvimento de modelos/biomodelos que representem mais fidedignamente os parâmetros biológicos requeridos. E isso só será conseguido com a integração de vários pesquisadores, estudos e técnicas multidisciplinares.

Visando a formação de um grupo multidisciplinar na área da manufatura aditiva voltada para a impressão 3D de modelos virtuais e físicos incorporando conceitos biológicos, a Divisão de Tecnologias Tridimensionais (DT3D), situada no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) que responde ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) vem desenvolvendo estudos relacionados a todas as etapas do processo de biofabricação, integrando diferentes estratégias.

1. ESTRATÉGIAS DA ENGENHARIA TECIDUAL / BIOFABRICAÇÃO

A biofabricação é classificada em três abordagens ou estratégias, tal como segue:

1ª Estratégia: baseada em *Scaffolds*

A Engenharia Tecidual por meio da Biofabricação, isto é, com a utilização de manufatura aditiva, inicialmente partiu de uma abordagem voltada à utilização de *scaffolds* (estruturas tridimensionais biodegradáveis e biocompatíveis de suporte para adesão e proliferação de células) para o acondicionamento físico de células, as quais, posteriormente, são responsáveis por gerar um novo tecido. O *scaffold* é de grande utilidade na adesão das células e na sua consequente estruturação tridimensional, muito próxima à de um tecido vivo. É, portanto, esperado que o *scaffold* sólido ofereça condições adequadas para o projeto de regeneração de tecidos com propriedades mecânicas, geometria e porosidade adequadas. Ao final, o *scaffold* deve ter sido degradado/absorvido integralmente pelo organismo quando o novo tecido tiver sido formado. As técnicas de fabricação de *scaffolds* (1ª Estratégia) têm avançado bastante, sendo a manufatura aditiva uma grande opção de ferramenta pela possibilidade de construção de estruturas 3D de geometrias complexas, com alta precisão e com tamanho de poros e porosidade controlados.

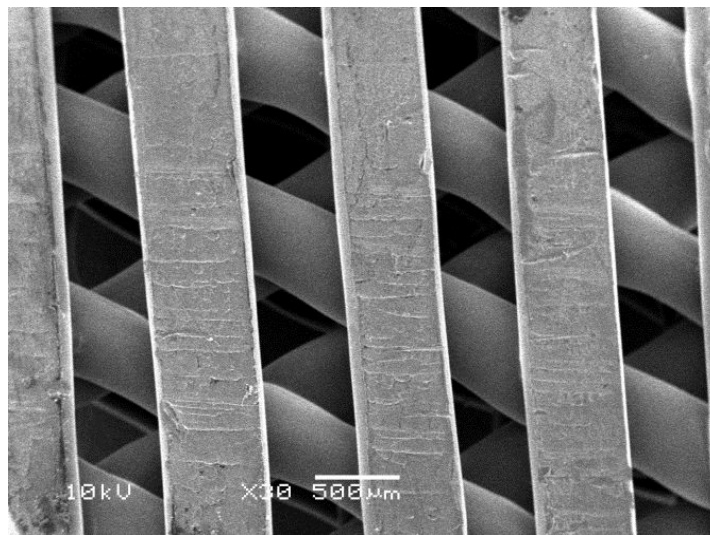


Figura 1. Exemplo de um *scaffold* fabricado por manufatura aditiva na DT3D/CTI visto por microscopia.

2ª Estratégia: baseada em Esferoides Teciduais

Uma nova abordagem foi desenvolvida baseada na construção de estruturas 3D esféricas celularizadas sem uso de *scaffold* sólido (*solid free scaffold*), ou seja, as células são empregadas de uma forma mais diferenciada e em aglomerados como demonstrado na figura 2 (MIRONOV et al., 2003). Isto significa dizer que células previamente selecionadas e/ou diferenciadas foram manipuladas e depositadas controladamente em densidade celular apropriada para formar agregados celulares, os quais são englobados por algum biomaterial, como os hidrogéis. Essa segunda abordagem demonstra que tecidos biológicos podem ser projetados com composições e formas específicas, explorando a característica de adesão célula-célula e a habilidade que células

sob cultura possuem de desenvolverem sua própria matriz extracelular e, por consequência, ajudar a reduzir e mediar respostas inflamatórias (JAKAB, 2010).

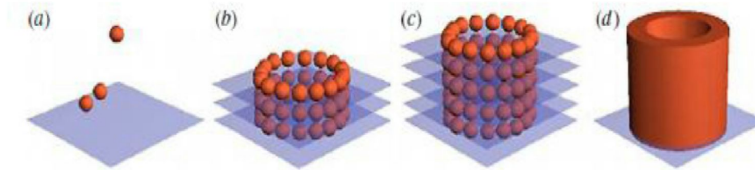


Figura 2. Segunda estratégia da engenharia tecidual/biofabricação: esferoides teciduais como blocos de construção na bioimpressão (MIRONOV et al., 2009).

A bioimpressão é uma variante emergente da aplicação biomédica da manufatura aditiva ou impressão 3D (BARTOLO et al., 2011).

Grandes esforços têm se concentrado na combinação de materiais biodegradáveis e células, devido à limitação encontrada com o uso de estruturas sólidas convencionais e nas abordagens utilizando apenas células não dependentes de *scaffolds* sólidos (*solid free scaffolds*). O uso de esferoides teciduais é vantajoso da perspectiva da alta densidade celular, estruturação 3D homogênea, construção da vascularização “de dentro pra fora”, ou seja, a vascularização já está sendo construída ao mesmo tempo em que os esferoides são depositados.

3ª Estratégia: baseada em *Scaffolds* + Esferoides teciduais

As duas primeiras estratégias apresentam vantagens e desvantagens. Pensando de forma otimizada e aproveitando as vantagens de cada uma para tentar compensar as limitações da outra, foi elaborada a terceira abordagem ou terceira estratégia da engenharia tecidual/biofabricação. Esta estratégia compreende a integração da estrutura mecânica de um *scaffold* sólido e incorpora em seu interior esferoides teciduais, que são mais consistentes que células depositadas isoladamente. Um novo tipo de *microscaffold*, batizado como *lockyball* surge como uma ideia original desenvolvida na DT3D/CTI.

A *lockyball* é uma esfera oca com superfície externa composta por pentágonos elevados e contendo vários ganchos, como pode ser visualizado na figura 3. Estes ganchos mimetizam estruturas naturais, como os carrapichos ou o velcro comercial, tornando possível que uma *lockyball* possa se aderir a uma vizinha, gerando uma malha tridimensional recheada de células.

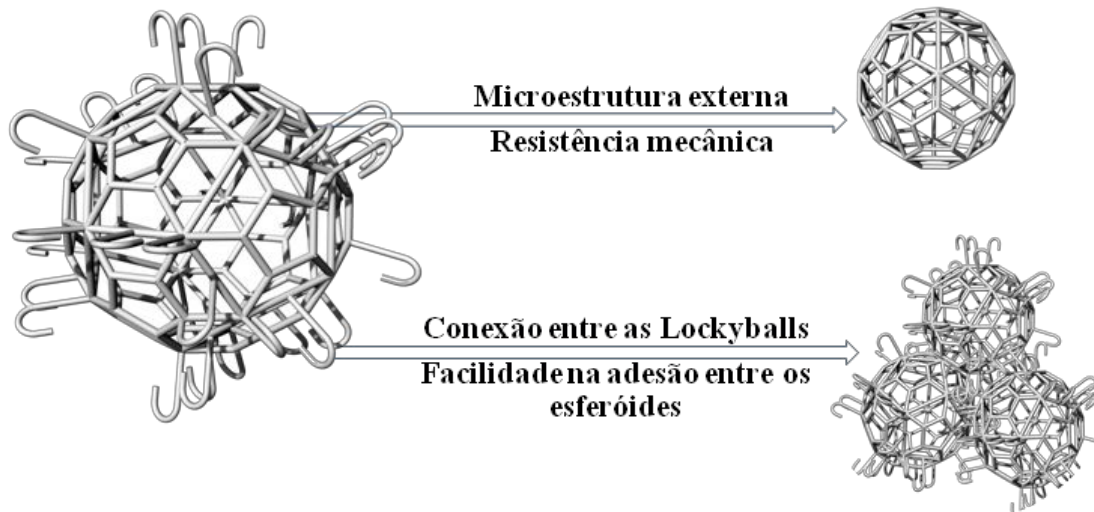


Figura 3. *Lockyballs* como terceira estratégia para a engenharia tecidual e/ou biofabricação.

No início do desenvolvimento, o primeiro passo foi projetar vários modelos de *lockyballs* virtualmente. Esses modelos foram impressos por manufatura aditiva, em escala de aproximadamente 6cm de diâmetro, e testados quanto à capacidade/facilidade de se conectar com outras *lockyballs* do mesmo tipo. Uma vez definido o projeto mais eficiente em termos de conectividade, o mesmo foi enviado a parceiros na Europa, já que o Brasil não possui equipamento de impressão do dispositivo em micro escala. O processo utilizado para a fabricação das *lockyballs* é conhecido como "polimerização por dois fótons". A escala real original da *lockyball* é em torno de 200 micrômetros de diâmetro (REZENDE et al., 2012).

Ensaio *in vitro* já têm sido realizados em parceria com o Inmetro do Rio de Janeiro, sendo que o primeiro passo foi verificado e validado, confirmando a viabilidade da celularização das *lockyballs* interconectadas (DANILEVICIUS et al., 2015).

A aplicação de ferramentas computacionais na biofabricação tem evoluído principalmente na criação de estruturas a partir de simulações de cenários com parâmetros que representem a estrutura do tecido relacionada a seu crescimento, visando à funcionalização do metabolismo tecidual. Sendo assim, a simulação computacional integrada com scripts e com ferramentas específicas cada vez mais eficientes, abre novas possibilidades na determinação de parâmetros mais exatos para novas soluções. Com relação às *lockyballs*, a figura 4 ilustra de uma forma genérica uma simulação computacional realizada com o objetivo de verificar os efeitos em termos de propriedades mecânicas relacionados a alterações na geometria ou na estrutura interna da *lockyball* (DANILEVICIUS et al., 2015).

V!RUS 11

É parametrização, baby!

revista do nomads.usp | nomads.usp jornal
issn 2175-974x | CC BY-NC
www.nomads.usp.br/virus| vnomads@sc.usp.br

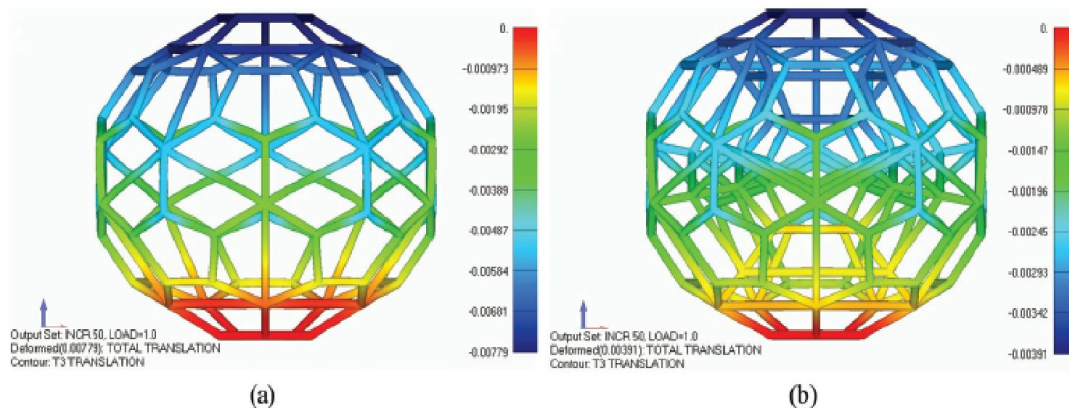


Figura 4. Propriedades mecânicas relacionadas a alterações na geometria de uma *lockyball* (a) sem estruturas internas e (b) com estruturas internas.

As *lockyballs* podem vir a ser uma solução muito interessante para diversas áreas da engenharia tecidual. A *lockyball* original, mostrada na Figura 3, é o ponto de partida de uma família de microestruturas que vem surgindo de acordo com aplicações específicas como, por exemplo, *lockyballs* voltadas para a regeneração capilar. O objetivo maior é que *lockyballs* preenchidas com esferoides teciduais possam garantir a formação de uma malha tridimensional mais reforçada e também maior tempo para que os esferoides se fundam e, portanto, viabilizem a construção do novo tecido.

2. ETAPAS DA BIOFABRICAÇÃO

Independentemente da estratégia empregada, a biofabricação é composta por uma sequência coordenada de etapas, nomeadas de pré-processamento, processamento e pós-processamento (figura 5). Estas etapas são brevemente discutidas a seguir.

V!RUS 11

É parametrização, baby!

revista do nomads.usp | nomads.usp jornal
issn 2175-974x | CC BY-NC
www.nomads.usp.br/virus| vnomads@sc.usp.br

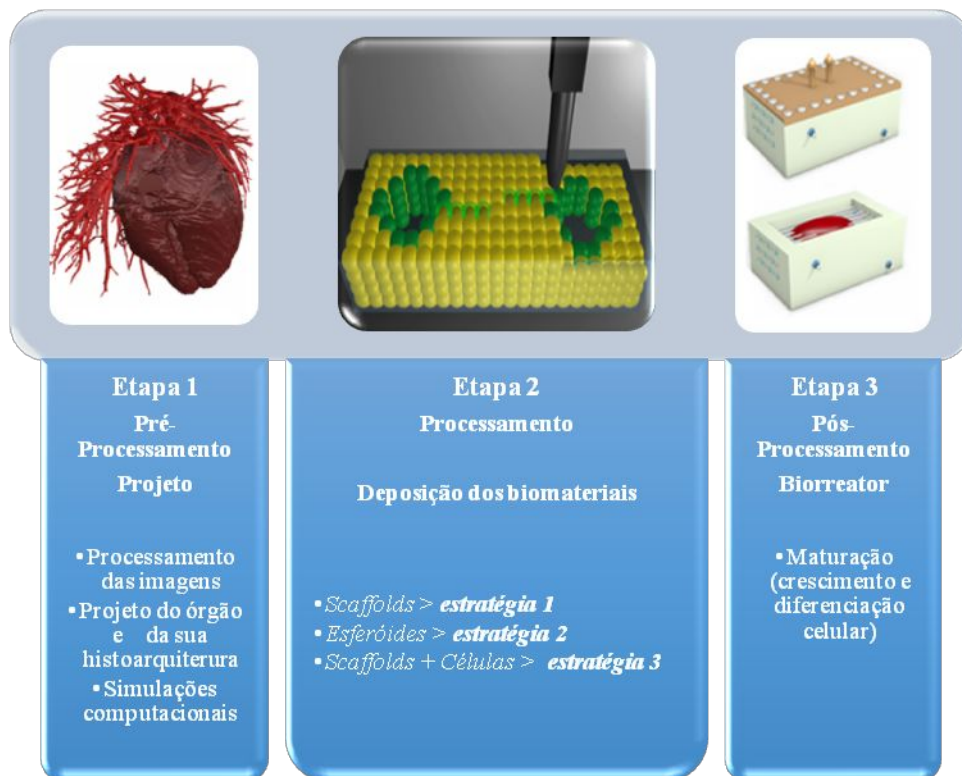


Figura 5. Principais etapas e estratégias utilizadas no processo de biofabricação e engenharia tecidual.

3. PRÉ-PROCESSAMENTO

O pré-processamento consiste da fase de concepção do projeto da estrutura ou órgão que se pretende fabricar. A preparação ocorre por meio da associação de softwares para o tratamento de imagens, de projetos auxiliados por computador (CAD) e de simulações computacionais. A representação do modelo de interesse por meio de projetos da organização estrutural, vascular no caso de tecidos biológicos, assim como da matriz extracelular, torna-se um desafio para este campo. O projeto de um órgão humano, por exemplo, é muito complexo. Expressar fenômenos biológicos e físicos do processo da formação de um novo tecido não é trivial. É necessário o domínio de temas como a embriologia e também do fenômeno de fusão dos esferóides teciduais. É preciso conhecer como as células agregadas vão se desenvolver após serem depositadas, colocadas lado a lado e iniciarem o processo natural de fusão. Que tipos de células e, por consequência, de esferóides, um órgão necessita para ser estruturado. São inúmeras perguntas a serem estudadas, discutidas e respondidas. Além de todas estas divagações, estas informações precisam estar compiladas e organizadas na forma de um arquivo de entrada para a impressora 3D, de forma que esta possa interpretar os dados e conduzir a impressão da estrutura desejada.

4. PROCESSAMENTO

De maneira geral, a etapa de impressão 3D dos biomateriais, ou processamento, para funcionar depende, dentre outros aspectos, do projeto e da disponibilidade de material para impressão. Sobre o projeto já foi discutido na etapa anterior. Com relação aos materiais, é necessário que haja quantidade suficiente para que a estrutura seja impressa por completo e de uma única vez.

V!RUS 11

É parametrização, baby!

revista do nomads.usp | nomads.usp jornal
issn 2175-974x | CC BY-NC
www.nomads.usp.br/virus | vnomads@sc.usp.br

No caso de órgãos humanos, serão necessários provavelmente alguns milhões de esferoides teciduais. Os esferoides apresentam diâmetro médio de 200 micrômetros. A fabricação dos esferoides deverá ser realizada de maneira automatizada. A microfluídica atualmente é o processo com maior potencial para fabricar a maior quantidade de esferoides por tempo. O acondicionamento dos esferoides é outro fator importante, pois o mesmo não deve iniciar o processo de fusão antes que sejam depositados pela impressora.

Em termos de impressora, já existem bioimpressoras comerciais, no entanto, o maior cliente continua sendo a academia. Há processos de fabricação com uso de deposição de filamento, de biotinta (solução contendo células ou esferoides teciduais) e de laser. No caso da bioimpressão (2ª Estratégia), os esferoides teciduais são depositados digitalmente, isto é, esferoide a esferoide, o que proporciona maior controle na estruturação do órgão. Diferentes tipos de esferoides podem ser utilizados de acordo com o tipo da constituição do órgão que se deseja. A estrutura 3D construída não pode ainda ser considerada como um órgão pronto. Na verdade, é chamada de *construct* e necessita obrigatoriamente de um estágio de desenvolvimento incubada em um equipamento que ofereça condições fisiológicas adequadas relacionadas a parâmetros como temperatura, suprimento de nutrientes, remoção de resíduos, estímulos mecânicos e elétricos, entre outros.

5. PÓS-PROCESSAMENTO

A etapa de pós-processamento da biofabricação está relacionada a um estágio em que *scaffolds* celularizados ou órgãos recém-fabricados são submetidos a condições físicas controladas, para que o material vivo tenha tempo de evoluir na formação do novo tecido. É um período de amadurecimento que antecede a implantação *in vivo* da solução. O equipamento que garante este processo é conhecido por biorreator. Muitos biorreatores vêm sendo estudados por vários grupos de pesquisa. Particularmente no caso da 2ª estratégia, com uso de esferoides teciduais, a DT3D vem realizando simulações computacionais visando interpretar parâmetros embutidos no biorreator.

As estratégias no processo de biofabricação são complexas e incluem arquitetura, mecânica estrutural, propriedades de superfície, produtos da degradação e composição de componentes biológicos, além das mudanças desses fatores com o tempo *in vitro* e/ou *in vivo* (HUTMACHER; SINGH, 2008). Há certamente uma necessidade muito grande da criação e incorporação de softwares e parâmetros mais apropriados para esta área, sendo imprescindível a integração de diversas áreas, principalmente da tecnologia da informação. É óbvio que, sem um modelo virtual, não é possível dar andamento às etapas seguintes da biofabricação. Além disso, a combinação com modelagem matemática, algoritmos biológicos e simulação computacional pode identificar potenciais problemas inesperados, encontrar uma melhor solução e otimizar modelos digitais e, assim, facilitar todas as etapas da biofabricação (REZENDE et al., 2015).

Levando-se em conta as três estratégias, de modo geral, a automação das etapas envolvidas na biofabricação necessita de uma série de discriminações, desde a obtenção das imagens, materiais/biomateriais utilizados, impressão da estrutura até o acondicionamento e a avaliação dos tecidos biofabricados. Esta automação do processo está inserida no objetivo de construção, na DT3D/CTI, de uma linha de biofabricação virtual que englobará, por exemplo, modelos computacionais e informações sobre os equipamentos integrantes, de forma que se possa dimensionar o esforço necessário e o custo estrutural para a fabricação de tecidos e órgãos humanos. A linha de biofabricação virtual tem também como proposta a visualização virtual da planta de biofabricação, análise e otimização do processo de biofabricação e treinamento de futuros membros da equipe de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BARTOLO, P.J.; DOMINGOS, M.; PATRÍCIO, T.; COMETA, S.; MIRONOV, V. Biofabrication Strategies for Tissue Engineering. In: RUI, P.; JORGE, P. (Ed.). **Advances on modeling in tissue engineering**. Spring, 2011, p. 137-76.
- DANILEVICIUS, P.; REZENDE, R.A.; PEREIRA, F.D.; SELIMIS, A.; KASYANOV, V.; NORITOMI, P.Y.; DA SILVA, J.V.; CHATZINIKOLAIDOU, M.; FARSARI, M.; MIRONOV, V. Burr-like, laser-made 3D microscaffolds for tissue spheroid engagement. **Biointerphases**, v. 10, n. 2, 2015.
- HUTMACHER, D.W.; SINGH, H. Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture. **Trends Biotechnol**, n. 26, p. 166-172, 2008.
- JAKAB, K.; NOROTTE, C.; MARGA, F.; MURPHY, K.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FORGACS, G. Tissue Engineering by Self-Assembly and Bio-printing of Living Cells. **Biofabrication**, n. 2, p. 1-14, 2010.
- MIRONOV, V.; BOLAND, T.; TRUSK, T.; FORGACS, G.; MARKWALD, R.R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 157-161, 2003.
- MIRONOV, V.; VISCONTI, R.P.; KASYANOV, V.; FORGACS, G.; DRAKE, C.J.; MARKWALD, R.R. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. **Biomaterials**, n. 30, p. 2164-74, 2009.
- REZENDE, R.A.; PEREIRA, F.D.A.S.; KASYANOV, V.; OVSIANIKOV, A.; TORGENSEN, J.; GRUBER, P.; STAMPFL, J.; BRAKKE, K.; NOGUEIRA, J.A.; MIRONOV, V.; SILVA, J.V.L. Design, physical prototyping and initial characterization of 'lockyballs'. **Virtual and Physical Prototyping**, n. 7, v. 4, p. 287-301, 2012.
- REZENDE, R.A.; KASYANOV, V.; MIRONOV, V.; SILVA, J.V.L. Organ Printing as an Information Technology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TISSUE ENGINEERING, ICTE2015, An ECCOMAS Thematic Conference, 4. **Procedia Engineering**, n. 110, 2015, p. 151-158.