

Estudo das tecnologias de segmentação tridimensional para a saúde.

Lívia H. M. Teixeira^{1;2}, Leonardo M. R. Machado,¹ Marcília V. Guimarães¹, Pedro Y. Noritomi¹

¹Laboratório Aberto de Tecnologias Tridimensionais – LAPRINT
CTI Renato Archer – Campinas/SP

²Faculdade de Engenharia Biomédica
Universidade Pontifícia Universidade Católica – Campinas/SP

{lteixeira, lmachado, mvguimaraes, pnoritomi}@cti.gov.br

Abstract. *Stem cells have been a highly studied topic lately due to their high capacity for renewal and differentiation, enabling the generation of new tissues and their potential use in treating injuries and even diseases such cancer, Alzheimer's, liver cirrhosis, etc. With this in mind, engineering has started creating molds that function as a kind of stamp for a compartment with hydrogel. These molds consist of a lower portion composed of a semi-sphere, where the stem cells will be attached, and an upper hexagonal portion. Thus, the size of the semi-spheres is of utmost importance for the cultivation. Therefore, the objective of this study is to create these parameterized molds, allowing the diameter of the semi-sphere to be chosen according to the researcher's needs, enabling greater control and customization in cell culture.*

Keywords: *spheroids; mold; parameterization.*

Resumo. *Células tronco vem sendo um tema muito estudado atualmente, devido a sua alta capacidade de renovação e diferenciação, o que permite a geração de novos tecidos e na terapia de lesões e até mesmo doenças, como câncer, Alzheimer, cirrose hepática, etc. Pensando nisso, a engenharia começou a criar moldes que servem como uma espécie de carimbo para um compartimento com hidrogel. Esses moldes consistem em uma porção inferior composta por uma semi esfera, onde serão acoplados as células tronco, e uma porção superior hexagonal. Logo, o tamanho das semi esferas são de suma importância para o seu cultivo. Portanto, o objetivo deste estudo consiste em criar esses moldes parametrizados, de modo que o diâmetro da semi esfera poderá ser escolhido de acordo com as necessidades do pesquisador, possibilitando um maior controle e personalização no cultivo celular.*

Palavras-chaves: *esferoides; molde; parametrização.*

1. Introdução

Pesquisas com células-tronco estão se expandindo na medicina devido à sua notável capacidade de renovação e diferenciação, o que lhes permite gerar vários tipos de tecidos e até mesmo regenerar lesões [Alves et al. 2019]. Os resultados promissores desses estudos sugerem que as células tronco podem ser uma terapia futura para uma ampla gama de

doenças, incluindo Alzheimer, câncer, diabetes, cirrose hepática e doença de Parkinson [Alves et al. 2019] [e Souza et al. 2003]. A diabetes, por exemplo, é um distúrbio resultante da insuficiência de insulina, gerada pelas células beta do pâncreas, ou da sua ação inadequada, podendo ser classificada como tipo 1 ou tipo 2 [Souza et al. 2012]. Através do uso de células tronco, espera-se obter uma fonte de células beta para produzir a insulina essencial para a regulação do organismo humano. [de Oliveira Andrade et al. 2012].

Contudo, o cultivo dessas células não é tão simples. Inicialmente, as células-tronco eram cultivadas em ambientes bidimensionais (2D). Entretanto, esse método enfrentava várias limitações, uma vez que era considerado altamente artificial, não representando adequadamente o comportamento real dessas células no organismo. Com o intuito de ultrapassar essas limitações, a engenharia passou a desenvolver modelos tridimensionais (3D) de cultivo celular, que de forma mais eficaz simulam o microambiente natural dos órgãos e tecidos ([Decarli et al. 2022]).

Esses modelos seriam projetados para criar um ambiente onde as células troncos seriam cultivadas na forma de esferoides celulares. Os esferoides celulares consistem em agregados de células que se auto organizam tridimensionalmente. Elas apresentam vantagens distintas em comparação com ambientes bidimensionais, devido a certas características, tais como a estabilidade morfológica, aumento da atividade metabólica, polarização do citoesqueleto, maior viabilidade celular e expressão gênica e proteica semelhante ao ambiente *in vivo* ([Charelli 2021]). Além disso, os esferóides permitem a criação de tecidos de maior escala com uma organização estrutural mais aprimorada ([Daly and Kelly 2019]).

Sabendo disso, a engenharia passou a criar moldes cilíndricos com micropinos dispostos em uma de suas extremidades. Esses micropinos são compostos por uma porção hexagonal superior e uma semiesfera em sua porção inferior. No entanto, estudos têm constatado que o tamanho desses esferóides desempenham um papel crucial nos resultados obtidos. Quando os esferóides são maiores, por exemplo, aumenta significativamente a probabilidade de ocorrer hipóxia, ou seja, uma baixa disponibilidade de oxigênio, e restrição de nutrientes para as células agregadas próximas ao centro do esferóide [Decarli et al. 2022].

Considerando essa informação, fica evidente que o tamanho do esferóide desempenha um papel de extrema importância para fins de pesquisa e desenvolvimento. Portanto, o objetivo dessa pesquisa é desenvolver modelos tridimensionais de carimbos contendo esferóides, nos quais as células tronco serão cultivadas. Esses modelos serão parametrizados, permitindo que os cientistas criem esferóides com dimensões específicas necessárias para suas respectivas pesquisas.

Para isso, foi utilizado uma extensão do Rhinoceros® (Robert McNeel & Associates, Seattle, USA), software destinado para o desenvolvimento de modelos 3D, chamada Grasshopper, que permite criar desenhos em CAD por programação. Além disso, essa extensão permite o uso da linguagem de programação Python, que foi de suma importância para efetuar a disposição dos micropinos parametrizados na extensão do suporte do carimbo.

2. Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa é desenvolver carimbos personalizados com micropinos, composto por uma semiesfera em sua porção inferior e um hexágono em sua porção superior, que serão dispostos na base do carimbo. Esses micropinos serão projetados com medidas que podem variar de acordo com o raio da semiesfera escolhido pelo usuário. Com isso, espera-se também baratear o custo para a fabricação do desenho em CAD e otimizar o seu tempo de produção.

3. Materiais e Métodos

3.1. Geometria do molde

O molde consiste em uma porção cilíndrica na qual os micropinos estarão posicionados. Esses micropinos possuem uma geometria complexa, dividida em uma parte superior e em uma parte inferior. A porção superior é formada por um hexágono, enquanto a parte inferior é composta por uma semiesfera na qual as células tronco são dispostas. Estes micropinos ficarão unidos em uma espécie de carimbo em formato cilíndrico oco, de modo que o usuário possa manuseá-lo corretamente. A Figura 1 mostra um fluxograma de como foi criado o molde.

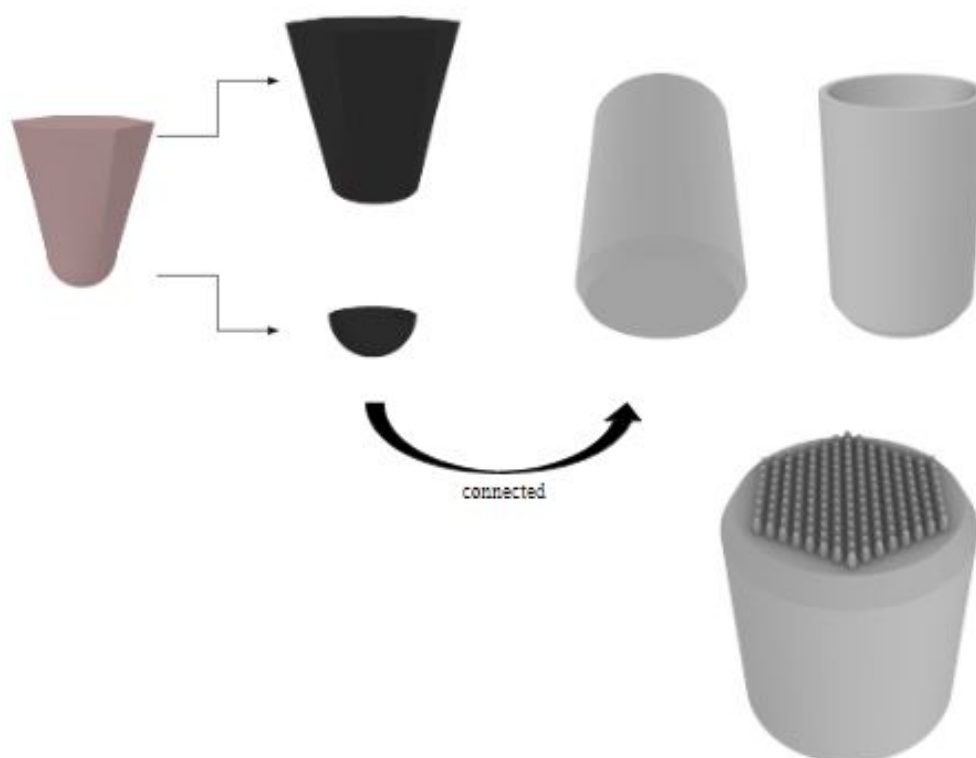


Figura 1. Fluxograma de como foi criado o molde

3.2. Parametrização

A parametrização consistiu em criar um molde, onde os micropinos teriam um formato fixo, todavia com dimensões diferentes, estas ficando em função do raio da semiesfera que poderá ser selecionada pelo usuário do software.

Para isso, utilizou-se o Grasshopper, uma extensão do software Rhinoceros® que foi implementado para facilitar a programação, nele é possível utilizar o Python. Para este projeto em específico, a linguagem de programação Python foi utilizada para criar uma listagem de pontos onde ficariam dispostos na base do cilindro os hexágonos, como poderá ser visto ao decorrer do artigo.

A priori, criou-se um *number slide*, comando que permite criar uma listagem de números. Esses números seriam aqueles disponíveis para a escolha do usuário referente ao raio da semiesfera. Posteriormente, foi criado 3 pontos com coordenadas cartesianas referentes ao tamanho do raio, porém com vetores em direções diferentes, cada qual em um plano pré determinado. Com isso, foi possível criar, através de arcos, o formato de 1/4 de uma semiesfera completa. Em seguida, essa figura foi preenchida como na Figura 2A e utilizou-se o comando *polar array* para formar a semiesfera completa como aparece na Figura 2B.

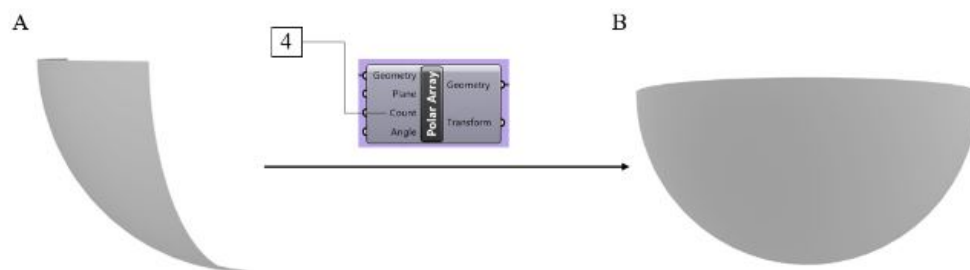


Figura 2. (A) 1/4 da semiesfera e usando. (B) Semiesfera completa.

Subsequentemente, foi necessário criar a porção superior, que neste caso seria o hexágono. A ideia seguiu o mesmo raciocínio da semiesfera. Fora criada coordenadas que formariam 1/6 do hexágono, já que o mesmo é regular e todos os seus lados possuem a mesma dimensão. As coordenadas foram baseadas em uma equação que dá o valor do seu lado em função do raio da esfera. Com isso, através de um arco, foi criado a porção do hexágono que se ligaria a semiesfera, enquanto com retas foi possível criar o resto do hexágono, formando assim seu formato inicial, que logo foi preenchida como mostra a Figura 3A e com o *polar array* formou-se a geometria superior completa exemplificado na Figura 3B.

Em seguida, esses micropinos deveriam ser dispostos no suporte cilíndrico. Para isso, foi utilizado a linguagem de programação Python para criar uma lista de pontos que seriam os pontos centrais do hexágono em uma das extremidades do suporte. Assim foi possível distribuir os micropinos no suporte, sem que houvesse sobreposição entre eles, e finalizar o molde, como mostra a Figura 4.

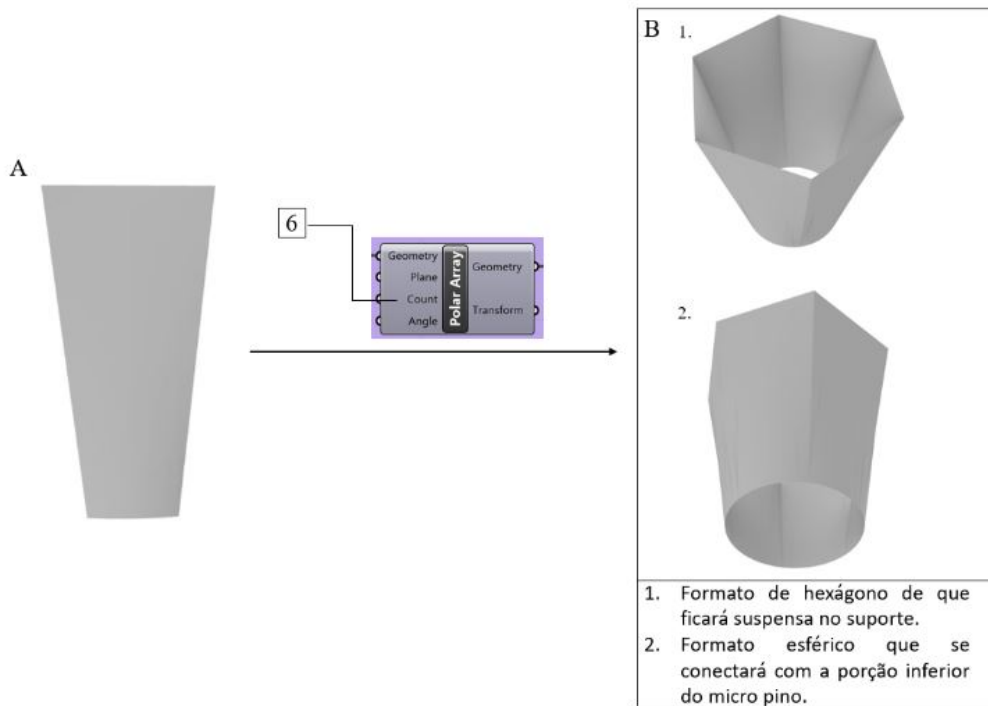


Figura 3. (A) Lado do hexágono (B) Hexágono completo

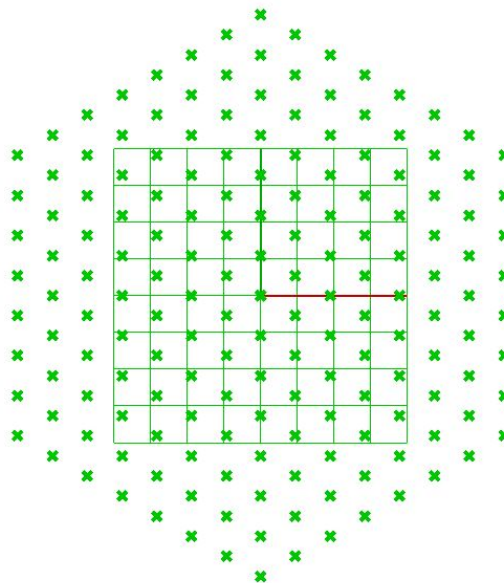


Figura 4. Pontos centrais do hexágono

4. Resultados e discussão

Este estudo teve como objetivo criar desenhos parametrizados de moldes para o cultivo *in vitro* de esferoides celulares usando um software CAD. A parametrização foi realizada por meio de uma extensão do software Rhinoceros®, conhecida como Grasshopper, que permite utilizar linguagem de programação para realizar os desenhos e também possibilita o uso do Python para auxiliar em todo o processo de construção.

A variável chave em toda a operação é o raio da semiesfera, uma parte fundamental importante no estudo de esferóides, já que são neles que as células tronco serão cultivadas. A dimensão da diagonal do losango é totalmente determinada pelo raio dessa semiesfera, ajustando-se conforme a medida escolhida pelo usuário para o seu raio. Como mostra a Figura 5.

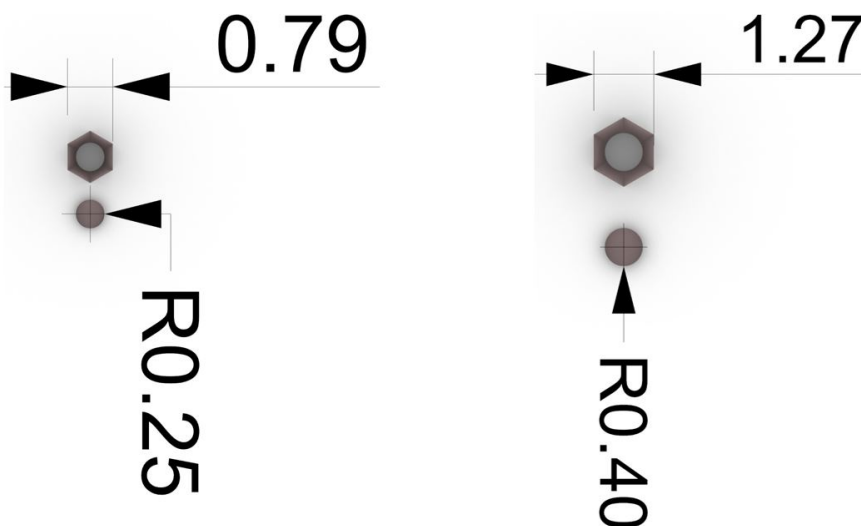


Figura 5. Dimensão do diâmetro varia de acordo com o raio da semiesfera.

Com a ajuda do Python, foi possível distribuir todos os micropinos ao longo da superfície do suporte, que serviria como carimbo para o molde, de modo a evitar qualquer sobreposição entre eles na placa de suporte.

A Figura 6 mostra micromoldes desenvolvidos com diâmetros diferentes dos micropinos.

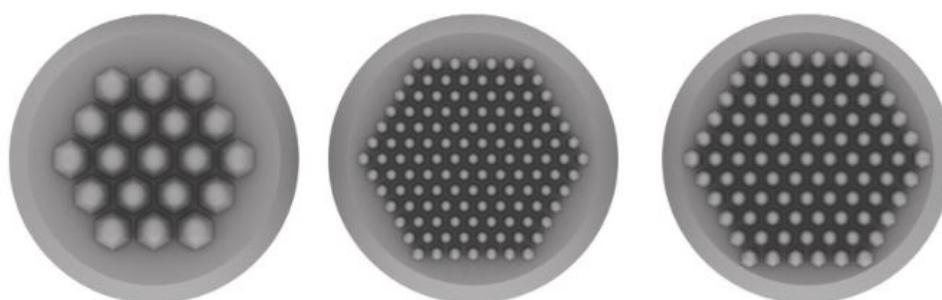


Figura 6. Micromolde finalizado com diâmetros da semiesfera diferentes.

5. Conclusão

O objetivo desta pesquisa é desenvolver micromoldes parametrizados para o cultivo celular, visando reduzir os custos de impressão e agilizar o processo de criação desses moldes.

O processo de parametrização foi feito considerando o diâmetro das semiesferas dos micropinos onde os esferoides celulares se alojarão. Postando, com a parametrização desse dispositivo, foi possível modificar todo o modelo de forma simplificada, facilitando a criação dos desenhos em software CAD.

6. Agradecimentos

Desejo expressar meu profundo agradecimento à comissão, ao CNPq e ao CTI por me concederem essa valiosa oportunidade de trabalho com a bolsa. Sem o suporte deles, eu não teria tido acesso a esse conhecimento enriquecedor.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão à minha co-orientadora Marcília V. Guimarães, pela sua paciência e dedicação ao me ensinar e auxiliar durante todo o processo de aprendizagem na construção do modelo parametrizado para o cultivo celular. Seu apoio foi fundamental para o meu progresso.

Também quero reconhecer e valorizar a generosidade do Leonardo Mendes Ribeiro Machado, que compartilhou seu conhecimento de forma tão generosa e contribuiu significativamente para elevar a qualidade desse processo. Sua colaboração foi inestimável para o sucesso do projeto.

Não posso deixar de agradecer imensamente ao Pedro Y. Noritomi, meu orientador, por seu excepcional trabalho e orientação. Ele não apenas me proporcionou crescimento acadêmico, mas também pessoal, sendo um guia fundamental nessa jornada.

Adicionalmente, desejo expressar minha gratidão ao Fábio de Souza Azevedo por sua valiosa assistência na criação do código Python, uma parte essencial da pesquisa que foi fundamental para a conclusão bem sucedida do modelo parametrizado.

Referências

- Alves, S., Cottafava, S., Ferro, C. A., SANTOS, J. A., SANTOS, K. F., CIPRIANO, D. Z., FRASSON, F., and DIAS, L. A. d. S. (2019). *O uso terapêutico de células tronco*. Revista Saúde em Foco–Edição.
- Charelli, L. (2021). *Esferoides celulares e dispositivos microfluídicos na biofabricação*. Bioedtech.
- Daly, A. C. and Kelly, D. J. (2019). *Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers*. Elsevier.
- de Oliveira Andrade, L. J., de Melo, P. R. S., França, L. S., and Bittencourt, A. M. V. (2012). Terapia com células-tronco em diabetes mellitus. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 11(1):79–85.
- Decarli, M. C., de Castro, M. V., Nogueira, J. A., Nagahara, M. H. T., Westin, C. B., de Oliveira, A. L. R., da Silva, J. V. L., Moroni, L., Mota, C., and Moraes, Â. M. (2022). *Development of a device useful to reproducibly produce large quantities of viable and uniform stem cell spheroids with controlled diameters*. Elsevier.
- e Souza, V. F., Lima, L. M. C., de Almeida Reis, S. R., Ramalho, L. M. P., and Santos, J. N. (2003). *Células-tronco: uma breve revisão*. Revista de ciências médicas e biológicas.

Souza, C. F. d., Gross, J. L., Gerchman, F., and Leitão, C. B. (2012). Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 56:275–284.