

Aplicação de programação na geração de estudos para bioengenharia

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, pnoritom}@cti.gov.br

Abstract. *Stem cells have great potential in cellular therapies, tissue engineering, and regenerative medicine. Three-dimensional culture methods, as opposed to traditional monolayer cultures, enhance cellular interactions and more accurately mimic in vivo cellular behavior. This project evaluated the dimensions (height and radius) of micropillars in a device for culturing cellular spheroids, developed in Grasshopper for Rhinoceros® after additive manufacturing. Dimensional variations, conformity with software specifications, and the fidelity of the designed geometry were analyzed. To this end, three molds with identical dimensions were printed and examined using micro-computed tomography. The results indicated variations in the dimensions of the designed micropillar compared to the printed one. It is concluded that adjustments to the radius and height parameters in the software will be necessary to ensure greater accuracy of the printed piece.*

Keywords: *Stem cells; additive printing; microtomography.*

Resumo. As células-tronco possuem grande potencial em terapias celulares, engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Métodos de cultivo tridimensionais, em contraste com os tradicionais de monocamada, aprimoram as interações celulares e mimetizam de forma mais fiel o comportamento celular in vivo. Este projeto avaliou as dimensões (altura e raio) de micropinos em um dispositivo para cultivo de esferoides celulares, desenvolvido no Grasshopper do Rhinoceros®, após impressão aditiva. Foram analisadas as variações dimensionais, a conformidade com as especificações do software e a fidelidade da geometria projetada. Para isso, três moldes com dimensões idênticas foram impressos e examinados por microtomografia computadorizada. Os resultados indicaram variações nas dimensões do micropino projetado em comparação com o impresso. Conclui-se, portanto, que será necessário ajustar os parâmetros de raio e altura no software para garantir maior precisão da peça impressa.

Palavras chaves: *célula tronco; impressão aditiva; microtomografia.*

1. Introdução

As células-tronco (CTs) apresentam um enorme potencial para uso em terapias celulares, engenharia de tecidos e medicina regenerativa, além de aplicações nas áreas farmacêutica

e biotecnológica. Elas são capazes de se auto-renovar e de se transformar em tipos celulares especializados, dependendo da fonte de onde são isoladas. Contudo, a utilização de CTs em aplicações clínicas requer uma grande quantidade e alta qualidade de células. Isso torna necessário expandir as CTs em larga escala e garantir uma diferenciação eficiente e uniforme em células funcionais derivadas [McKee and Chaudhry 2017].

Os métodos tradicionais de cultivo celular *in vitro*, predominantemente baseados em monocamadas, estão sendo contrastados com sistemas celulares que permitem a organização tridimensional das células. Nesses sistemas, as interações entre as células são aprimoradas, aumentando as chances de formação de microambientes que mimetizam ou se assemelham à distribuição natural tridimensional dos tecidos. A disposição das células em três dimensões também resulta em uma dispersão de forças mecânicas que influenciam sua morfogênese. Em outras palavras, o comportamento fisiológico de um grupo de células é determinado não apenas pelo tipo celular em questão, mas também pela organização espacial dessas células, bem como pela distribuição das zonas de comunicação em suas superfícies [Teixeira et al. 2023].

A tomografia computadorizada é uma técnica não invasiva que possibilita a visualização interna de um objeto sob análise, exposto a uma fonte de radiação ionizante, como raios X, gama ou nêutrons, sem exigir preparações físicas ou químicas da amostra. Essa técnica é aplicada em diversas áreas da ciência, incluindo medicina, biologia, e indústria. A microtomografia computadorizada, por sua vez, permite uma diferenciação interna de estruturas com uma precisão que varia de micrômetros a nanômetros [Alves 2012].

Com base nisso, o objetivo deste projeto é avaliar as dimensões (altura e raio) de micropinos de um dispositivo para cultivo de esferoides celulares desenvolvido e parametrizado na extensão Grasshopper do software de modelagem Rhinoceros® (Robert McNeel & Associates, Seattle, USA), após a sua fabricação por manufatura aditiva. Pretende-se verificar se ocorreram variações de dimensões com o processo de impressão, se as dimensões estão de acordo com as especificadas no software e se a geometria hexagonal da base do micropino foi fielmente reproduzida. Para isso, foram impressos três moldes com as mesmas dimensões e todas as imagens foram capturadas pelo microtomógrafo.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção do modelo STL do micromolde para o cultivo celular

A primeira etapa consistiu no desenvolvimento dos dispositivos para cultivo celular no software Rhinoceros. Os moldes que foram impressos são compostos por uma porção cilíndrica onde micropinos foram posicionados. Esses micropinos apresentam uma geometria dividida em duas partes: uma superior, em formato de hexágono, e uma inferior, em forma de semiesfera, no qual as células-tronco serão acomodadas. Os micropinos estão distribuídos de forma organizada na porção cilíndrica, garantindo que não haja sobreposição entre eles, conforme ilustrado na Figura 1A do fluxograma. Esses dispositivos foram impressos no equipamento Connex350 que utiliza a tecnologia Polyjet, utilizando o material resina VeroClear.

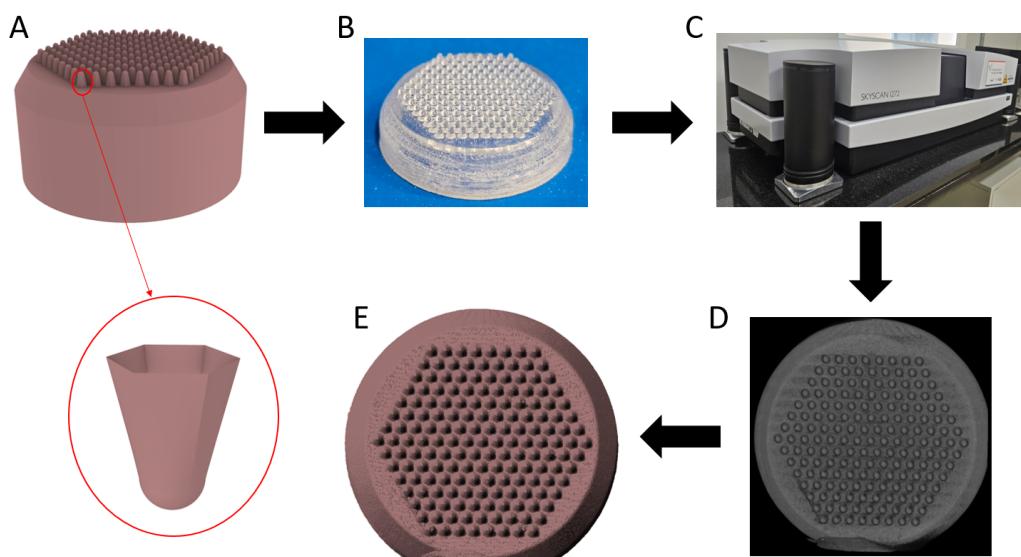


Figura 1. Fluxograma da obtenção do modelo.

Após a criação e parametrização do micromolde no Grasshopper, eles foram impressos usando tecnologia PolyJet e o material escolhido foi a resina rígida VeroClear (Fig.1B). Como o objetivo do trabalho consiste em verificar a precisão da impressão com relação ao modelo computacional, optou-se pelo uso do microtomógrafo SkyScan 1272 (Fig.1C) para a obtenção do modelo STL dos micromoldes impressos. Os parâmetros para a aquisição das imagens no microtomógrafo foram: energia de 70 kV, corrente de 140 μ A e filtro de alumínio de 0,5 mm. A Figura 1D mostra o dispositivo após reconstrução 3D no software NRecon do microCT.

O modelo em STL gerado foi aberto no software Rhinoceros 7 para a análise das dimensões de altura e raio da semiesfera dos micropinhos do dispositivo, conforme mostrado na Fig.1E. Essas dimensões foram escolhidas porque influenciam diretamente no desenvolvimento dos esferoides celulares. O raio e a altura dos micropinhos determinam o volume do microambiente onde os esferoides se formam; micropinhos maiores resultam em esferoides maiores, enquanto micropinhos menores podem restringir o crescimento, levando a esferoides menores [Di Caprio and Burdick 2023]. Além disso, a geometria dos micropinhos afeta a difusão de nutrientes e oxigênio. Esferoides maiores podem ter um núcleo central com menor acesso a nutrientes e oxigênio, podendo resultar em um núcleo necrótico, enquanto esferoides menores tendem a ter uma distribuição mais uniforme desses elementos [Decarli et al. 2022]. Para uma visualização mais clara, ampliamos a porção superior do molde. Além disso, cortamos na altura dos micropinhos para conferir a formação do hexágono. Esses resultados estão mostrados nas Figuras 2A e 2B, respectivamente.

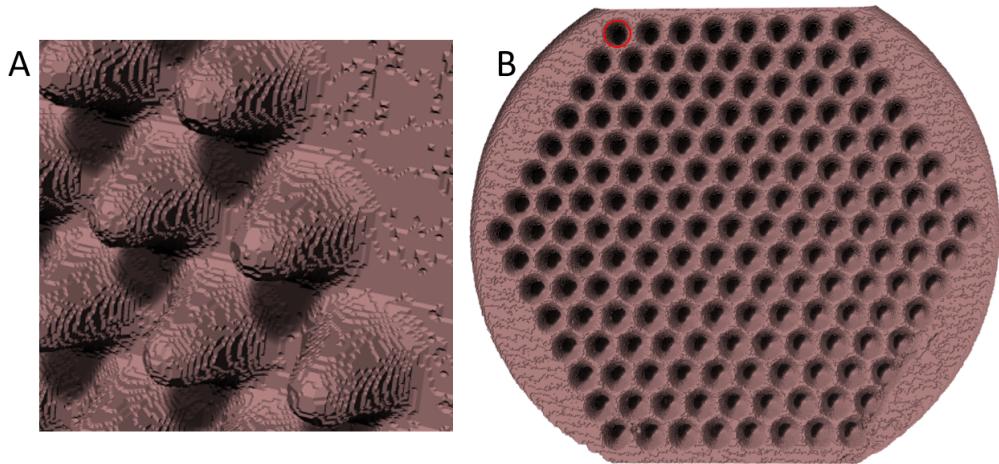


Figura 2. (A) Imagem Ampliada. (B) Imagem cortada na altura dos micropinos.

2.2. Método

Para verificar se as dimensões foram preservadas ou se é necessário realizar correções no Grasshopper para atender às especificações previamente estabelecidas pelo usuário no software, foi realizada uma sobreposição dos dois modelos: o criado no Grasshopper (na cor verde) e a imagem obtida pelo microtomógrafo (na cor marrom), como mostra a Figura 3. Essa sobreposição permitiu a interseção na altura exata do raio da semiesfera, possibilitando a medição dos valores impressos.

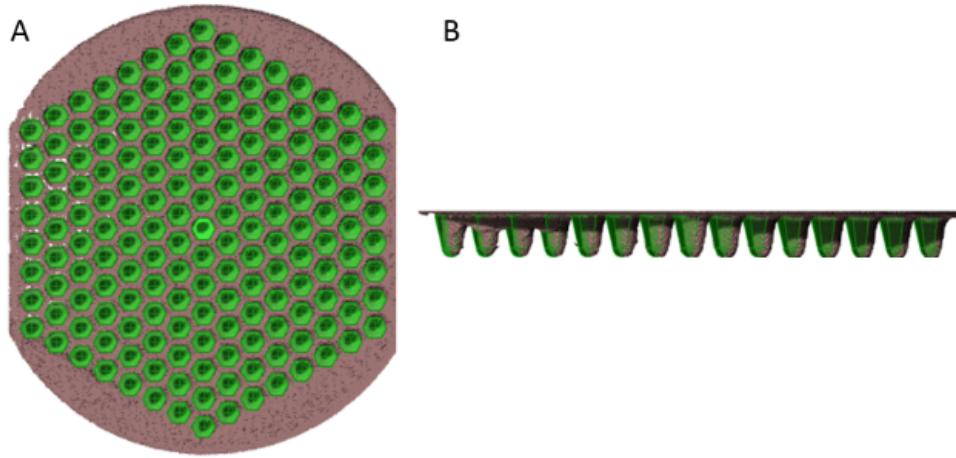


Figura 3. (A) Sobreposição vista superior. (B) Sobreposição vista lateral.

Para verificar as medidas dos raios, foi criado um plano de interseção na altura do raio da semiesfera, utilizando como base o modelo do Grasshopper. Em seguida, utilizamos o comando “meshintersect”, que mostra a interseção de duas malhas no plano, como apresentado na Figura 4A. Além disso, para verificar a altura dos micropinos, a malha foi cortada (Fig.4B). Com o recurso Gumball ativado, foi utilizado o comando “linear dimension”, começando a medição no centro da semiesfera e terminando, de forma perpendicular, na parte superior do molde, como mostra a Figura 4B.

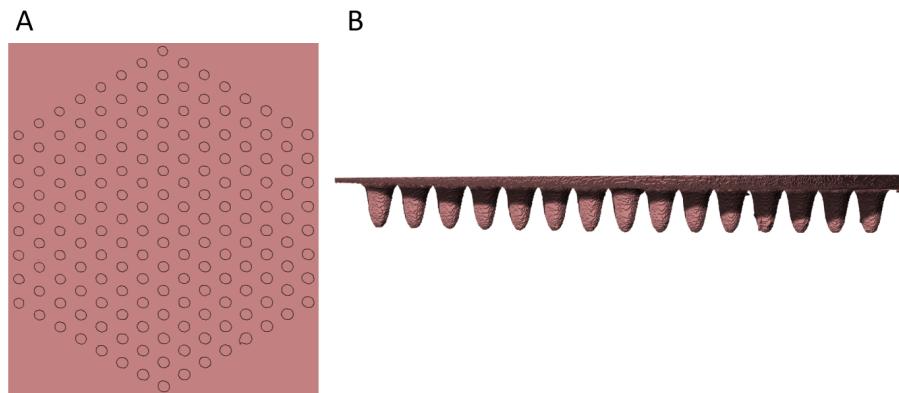


Figura 4. (A) Comando de interseção.(B) Resultado do comando no plano criado.

Para calcular a média das medidas (raio e altura) , foram selecionados nove micropinos aleatórios, conforme mostrado na Figura 5.

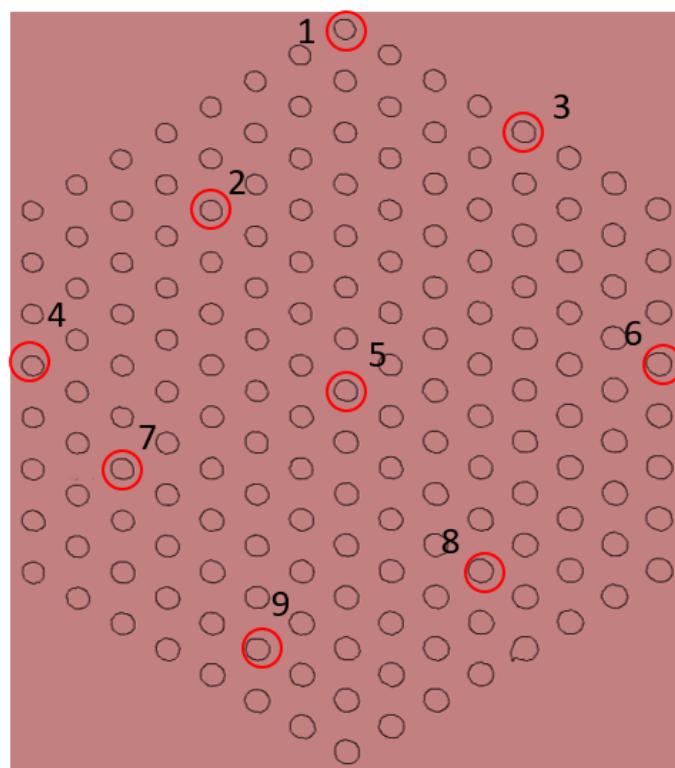


Figura 5. Semiesferas selecionadas para calcular a média dos seus raios a alturas.

Na Figura 6A, pode-se observar que toda a interseção é formada por pontos. Para isso, utilizamos o comando ”Curve 3 Points” para criar uma circunferência a partir de três pontos da interseção, conforme mostrado na Figura 6B, permitindo assim determinar o valor do raio.

Após esses procedimentos, é possível verificar o valor do raio da esfera em milímetros (mm) com o comando “Radial Dimension” como mostra a Figura 7.

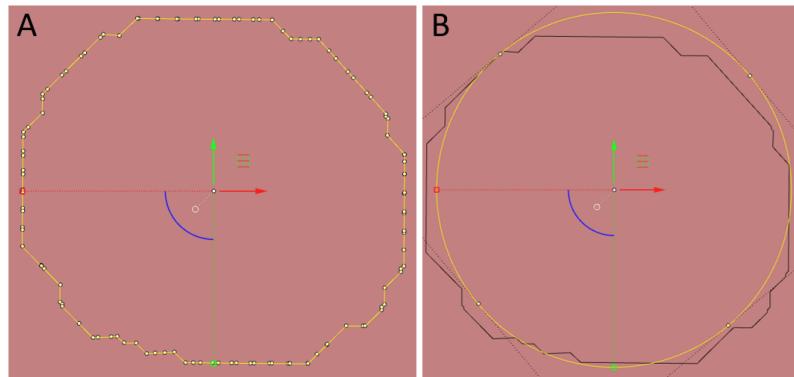


Figura 6. (A) Interseção formada por pontos. (B) Circunferência obtida a partir dos pontos selecionados.



Figura 7. Dimensão do raio da semiesfera em mm.

3. Resultado e discussão

O dispositivo foi projetado para cultivo celular, e as dimensões do raio e da altura dos micropinos são importantes para essa finalidade. Para avaliar a precisão da impressão dos modelos em resina VeroClear, utilizou-se um microtomógrafo para medir essas dimensões. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas abaixo.

A Figura 10 apresenta a tabela criada no software Excel que contém os resultados das medições dos raios e suas respectivas médias.

Colunas1	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
1	0,22	0,22	0,23
2	0,21	0,21	0,21
3	0,23	0,23	0,24
4	0,22	0,22	0,2
5	0,2	0,21	0,22
6	0,24	0,23	0,24
7	0,21	0,22	0,21
8	0,22	0,22	0,23
9	0,22	0,22	0,21
Média	0,22	0,22	0,22

Figura 8. Valores dos raios (mm).

Considerando que o raio previamente definido no Grasshopper é 0,25. Logo:

$$\frac{0,25}{100\%} = \frac{0,22}{x}$$

$$x = \frac{0,22 \times 100}{0,25}$$

$$x = \frac{22}{0,25} = 88\%$$

Portanto, houve uma perda de 12% na impressão.

Posteriormente, o mesmo foi feito com a altura dos micropinos, e a Figura 9 fornece esses valores.

Colunas1	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
1	1,09	1,1	1,09
2	1,1	1,1	1,1
3	1,11	1,11	1,12
4	1,12	1,13	1,11
5	1,1	1,11	1,12
6	1,13	1,12	1,11
7	1,13	1,13	1,12
8	1,14	1,13	1,13
9	1,11	1,1	1,1
Média	1,11	1,11	1,11

Figura 9. Valores das alturas (mm).

Considerando que a altura previamente definida no Grasshopper é 1,0. Logo:

$$\frac{1,0}{100\%} = \frac{1,11}{x}$$

$$x = \frac{1,11 \times 100}{1,0}$$

$$x = \frac{11}{1,0} = 111\%$$

Analisando os resultados acima, podemos concluir que a impressão não ocorreu conforme o esperado. Primeiramente, observamos que o hexágono do micropino não foi formado. Além disso, houve uma perda no processo de impressão: a dimensão esperada do raio era de 0,25 mm, mas a média das medições foi de 0,22 mm, resultando em uma

redução de 12%. Além disso, houve um aumento não esperado da altura do micropino, que obteve um ganho de 11%.

Um dos motivos para explicar a redução do raio e a não formação do hexágono após a impressão do micromolde é o tipo de resina que foi utilizado. A resina VerroClear é constituída por polimetilmetacrilato, amplamente conhecido como acrílico [Stratasys 2024]. É comum haver problemas na impressão, sendo a contração (ou encolhimento) do material um dos mencionados [Portela 2019]. O encolhimento de acrilatos e metacrilatos ocorre durante a polimerização devido à substituição de conexões de longa distância via força de Van der Waals. Essas substituições são responsáveis pelo encolhimento geral do material, o que pode gerar acúmulo de tensão interna, resultando em defeitos ou alterações dimensionais [Liqcreate].

O controle das dimensões de altura e raio do micropino é importante para otimizar as condições experimentais em estudos de cultivo celular 3D. Essas dimensões influenciam no volume do microambiente celular que pode comprometer a formação dos esferoides. Micropinos maiores, com raios acima de 300 micrômetros, facilitam a formação de esferoides maiores, mas podem comprometer a difusão de nutrientes e oxigênio, o que leva à formação de núcleos necróticos e morte celular. Em contraste, micropinos menores, com raios na faixa de 100 a 300 micrômetros, embora restrinjam o crescimento dos esferoides, promovem uma distribuição mais uniforme de nutrientes e oxigênio, prevenindo a necrose central e garantindo a viabilidade celular em toda a estrutura [DeCarli et al. 2021].

Uma das possíveis causas do aumento da altura do micropino após a impressão pode ser por conta das configurações da impressora, ou por conta da deformação do material durante a impressão.

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, observa-se uma perda de precisão nas medidas durante a impressão do molde. Portanto, é necessário ajustar as especificações no software para garantir a exatidão das dimensões após a impressão do modelo. Além disso, um dos objetivos era a impressão do hexágono, o qual não foi registrado na impressão, conforme ilustrado na Figura 2, podendo, portanto, concluir que a geometria dos micropinos poderia ser simplificada, ou seja, deixá-la em formato cônico, otimizando assim os comandos utilizados no Grasshopper.

5. Agradecimentos

Gostaria de expressar meu agradecimento ao comitê, ao CNPq, ao CTI e ao MCTI pela oportunidade e suporte com a bolsa, que foram essenciais para o meu aprendizado.

Agradeço profundamente à minha co-orientadora, Marcília V. Guimarães, pela paciência e dedicação. Seu apoio foi fulcral para a realização desse projeto.

Reconheço também a generosidade de Leonardo Mendes Ribeiro Machado, que contribuiu para a qualidade do projeto com seu conhecimento.

Meu imenso agradecimento a Pedro Y. Noritomi, meu orientador, por seu excepcional trabalho e orientação, que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Referências

- Alves, H. D. L. (2012). *Análise da porosidade de sedimentos geológicos usando a técnica de microtomografia computadorizada*. PhD thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- DeCarli, M. C., Amaral, R., dos Santos, D. P., Tofani, L. B., Katayama, E., Rezende, R. A., da Silva, J. V. L., Swiech, K., Suazo, C. A. T., Mota, C., Moroni, L., and Ângela Maria Moraes (2021). Cell spheroids as a versatile research platform: formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. *Biofabrication*, 13:032002.
- 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. *Biomaterials Advances*, 135:112685.
- Di Caprio, N. and Burdick, J. A. (2023). Engineered biomaterials to guide spheroid formation, function, and fabrication into 3d tissue constructs. *Acta biomaterialia*, 165:4–18.
- Liqcreate. Encolhimento linear de resinas de impressão 3d. Acesso em 20 agosto 2024.
- McKee, C. and Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 159:62–77.
- Portela, S. (2019). 20 principais erros de impressão e como resolvê-los. guia completo!
- Stratasys (2024). Veroclear™ - polyjet material. Acesso em 20 agosto 2024.
- Teixeira, L. H. M., Machado, L. M. R., Azevedo, F. S., Ikuno, I. M., Guimaraes, M. V., and Noritomi, P. Y. (2023). Automating the process of generating micromolds in computer-aided design (cad) for use in 3d cell culture. In *Proceedings of the 27º International Congress Mechanical Engineering - COBEM 2023*. International Congress Mechanical Engineering - COBEM.