

## **PRODUÇÃO 3D BIOARTIFICIAL DE TECIDOS E ÓRGÃOS – UMA REVISÃO**

BIOARTIFICIAL 3 D PRODUCTION OF TISSUES AND ORGANS – A REVIEW

PRODUCCIÓN 3D BIOARTIFICIAL DE TEJIDOS Y ÓRGANOS – UNA REVISIÓN

Alexandra Silva Fernandes (alexandrasilfer1997@gmail.com) \*

Francisco José Barbas Rodrigues (franciscobrodrigues@ipcb.pt) \*\*

### **RESUMO**

Avanços recentes na engenharia de tecidos permitiram adaptar novas tecnologias sustentadas na bioimpressão 3D para o fabrico de *Scaffolds layer-by-layer*, tecidos e órgãos viáveis. Dos diferentes tipos de bioimpressão destaca-se a bioimpressão a jato de tinta baseada num sistema de impressão por gotas, permitindo a produção de material orgânico; a bioimpressão por microextrusão, um método de impressão contínuo adequado à maioria dos *bioinks* utilizados na síntese de tecidos e órgãos; e a bioimpressão assistida por laser, permitindo a criação de padrões celulares. Numerosos tipos de tecidos estão atualmente sob investigação, cujas principais limitações de aplicabilidades centram-se na engenharia vascular e nervosa. Neste trabalho de revisão será apresentada, de uma forma geral, o processo de síntese de tecidos e órgãos 3D bioartificiais, uma abordagem aos diferentes tipos de tecnologias utilizadas para bioprodução 3D, as aplicações associadas à bioimpressão de tecido e/ou órgãos, e os desafios e perspetivas futuras associados a este mundo da engenharia tecidual e produção de tecidos e órgãos sintéticos. Particular atenção foi dada às experimentações realizadas neste âmbito e à utilização bem-sucedida destes tecidos e órgãos sintéticos na prática clínica.

Palavras-chave: *Scaffolds layer-by-layer*. Bioimpressão 3D. Bioimpressão a jato de tinta. Bioimpressão por microextrusão. Bioimpressão assistida por laser. Tecidos bioartificiais

### **ABSTRACT**

Recent advances in tissue engineering have allowed the adaptation of new technologies supported in 3D bioprinting for the fabrication of *Scaffolds layer-by-layer*, tissues and viable organs. Of the different types of bioprinting, inkjet bioprinting based on a droplet printing system allows the production of organic material; microextrusion bioimpression is a continuous printing method suitable for most *bioinks* used in the synthesis of tissues and organs and laser-assisted bioimpression enabling the creation of cellular patterns. Numerous types of tissues are currently under investigation, where the major limitations of applicabilities center on vascular and nerve engineering. In this work, the overall process of synthesis of bioartificial 3D tissues and organs will be presented, an approach to the different types of technologies used for 3D bioproduction, applications associated with bioimpression of tissue and / or organs, and the challenges and future perspectives associated with this world of tissue engineering and the production of synthetic tissues and organs. Particular attention has been paid to the experiments carried out in this field and to the successful use of these synthetic tissues and organs in clinical practice.

Keywords: Scaffolds layer-by-layer. Bioprinting 3D. Inkjet bioprinter. Microextrusion bioprinter. Laser-assisted bioprinter. Bioartificial tissues

## RESUMEN

Los avances recientes en la ingeniería de tejidos permitieron adaptar nuevas tecnologías sostenidas en la bioimpresión 3D para la fabricación de Scaffolds capa-by-layer, tejidos y órganos viables. De los diferentes tipos de bioimpresión se destaca la bioimpresión a chorro de tinta basada en un sistema de impresión por gotas permitiendo la producción de material orgánico; la bioimpresión por microextrusión es un método de impresión continuo adecuado para la mayoría de los bioinks utilizados en la síntesis de tejidos y órganos y la bioimpresión asistida por láser permitiendo la creación de patrones celulares. Numerosos tipos de tejidos están actualmente bajo investigación, en que las principales limitaciones de aplicabilidad se centran en la ingeniería vascular y nerviosa. En este trabajo de revisión se presentará, en general, el proceso de síntesis de tejidos y órganos 3D bioartificiales, un enfoque a los diferentes tipos de tecnologías utilizadas para la bioproducción 3D, las aplicaciones asociadas a la bioimpresión de tejido y / o órganos, y los desafíos y perspectivas futuras asociadas a este mundo de la ingeniería tisular y producción de tejidos y órganos sintéticos. Se ha prestado especial atención a los experimentos realizados en este ámbito y a la utilización exitosa de estos tejidos y órganos sintéticos en la práctica clínica.

Palabras clave: Scaffolds capa-by-layer. Bioimpresión 3D. Bioimpresión de chorro de tinta. Bioimpresión por microextrusión. Bioimpresión asistida por láser. Tejidos bioartificiales

\*Estudante do 4º ano da Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias em Castelo Branco

\*\* Investigador integrado na Unidade de Investigação Qualidade de Vida no Mundo Rural Investigador colaborador na Unidade de Investigação Sport, Health and Exercise Research Unit. Instituto Politécnico de Castelo Branco. Escola Superior de Saúde Dr Lopes Dias

Submitted: 04th June 2018

Accepted: 15th September 2018

## INTRODUÇÃO

A escassez de dadores e, conseqüentemente a insuficiente biodisponibilidade de órgãos viáveis para transplante é uma realidade bem conhecida e, atualmente tem tomado repercussões mais graves, tendo em conta que a maioria das pessoas em lista de espera na iminência de necessitarem de um órgão morrem antes do transplante ou sofrem com déficit de qualidade de vida prolongado<sup>4,13,22</sup>.

A síntese bioartificial de tecidos e órgãos tridimensionais (3D) tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, nomeadamente na última década, abrindo um novo caminho para a engenharia tecidual que tem sofrido excepcionais avanços, para a regeneração tecidual, transplantação e para aplicações farmacêuticas e farmacológicas<sup>1,12,21,24</sup>. Esta metodologia tem-se tornado um conceito estimulante no âmbito da engenharia tecidual e de órgãos inteiros tornando-se uma potencial solução para o problema de escassez de dadores de órgãos<sup>4</sup>. O processo referente à síntese deste tipo de matéria orgânica com funções físicas e biológicas adequadas, compreende um conjunto de processos sintéticos utilizados para mimetizar a síntese desses tecidos e órgãos no local anatómico correto, em que a maioria das construções celulares 3D bioartificiais correspondem a esferas celulares organizadas<sup>3,12,20,21</sup>. A produção sintética *in vitro* de tecidos e órgãos necessita, na maioria das vezes, de uma estrutura que sustente as células, denominada de *Scaffold layer-by-layer (Lbl)*, técnica ancestral funcional para muitas aplicações clínicas<sup>1,2,3,4,19,21</sup>. A *Lbl* consiste numa rede macromolecular que utiliza polímeros de hidrogel associados a proteínas da matriz extracelular (MEC) como a fibronectina (FN) e a gelatina (G), para a construção de *nanofilms* como um análogo altamente poroso da MEC (possui atividade biológica regenerativa com capacidade de bloquear o processo contrátil), uma cultura de proliferação celular, que pode compreender células-tronco pluripotentes, células epiteliais, endoteliais ou fibroblastos normais humanas organizadas do tecido ou órgão a sintetizar e um biorreator acoplado a biofatores adequados à estimulação do tecido (figura 1)<sup>1,2,3,19,21,23</sup>. Esta técnica não requer equipamentos nem funcionalidades complexas, não pressupõe elevada complexidade na sua construção e síntese, consistindo apenas na imersão de células em soluções proteicas da MEC e, estas podem ser utilizadas para formar qualquer tecido funcional<sup>17</sup>.

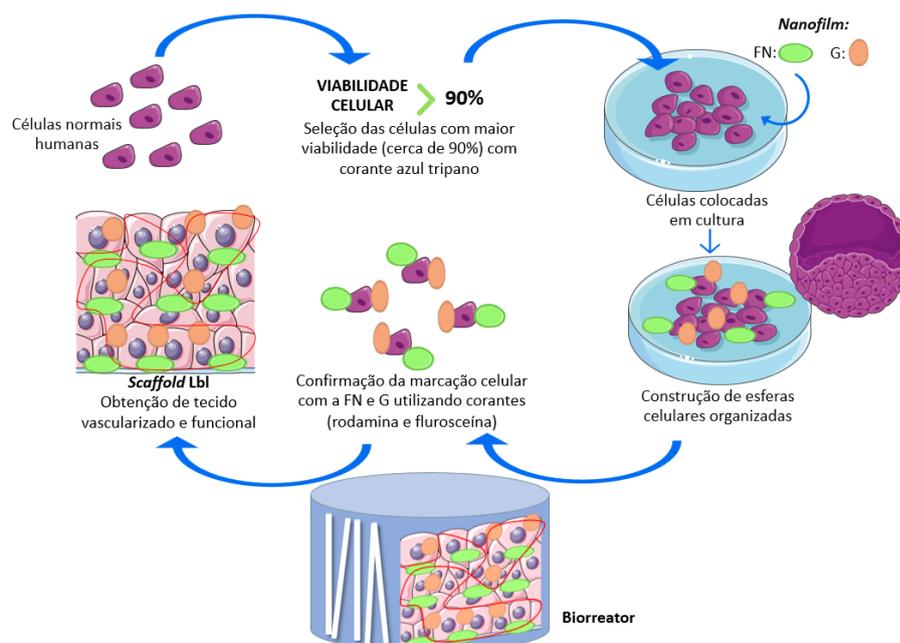


Figura 1: Metodologia de *Scaffolds Lbl* direcionada à produção de qualquer tecido 3D funcional e vascularizado utilizando células normais. Inicialmente são recolhidas células normais humanas e selecionadas aquelas que apresentam maior viabilidade utilizando um corante azul tripano, sendo estas depositadas em meio de cultura revestidas por nanofilms utilizando a técnica de *Lbl* associados a fibronectina (FN) e gelatina (G). Seguidamente são obtidas construções de esferas celulares organizadas e confirmada a marcação das células mais viáveis ligadas às proteínas utilizando corantes como a rodamina e a fluoresceína. As células marcadas voltam novamente para um meio de cultura, associando-se a este um biorreator que estimule a função das células obtendo-se tecido vascularizado e funcional<sup>1,2,3,17</sup>.

O campo da engenharia de tecidos tem notado avanços recentes consideráveis que permitiram desenvolver e produzir tecidos e órgãos, como por exemplo tecido cardíaco, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, traqueia, pele, nervos periféricos, nariz, orelha, fígado, pâncreas, bexiga, entre outros<sup>1,2,12,20,21,23</sup>. O intuito desta abordagem centra-se na restauração da função de um tecido específico através de um cruzamento interdisciplinar baseado nas ciências dos materiais conjuntamente com a sua mecânica, com a biologia, a medicina e a engenharia<sup>24</sup>. Estes tecidos e órgãos estão descritos como funcionais *in vivo* podendo ser usados na substituição bem-sucedida de um tecido ou órgão que apresente problemas e/ou defeitos funcionais/anatómicos e também com o intuito de colmatar o déficit de órgãos para transplantação<sup>7,23</sup>. Várias são as abordagens de microprodução de tecidos e órgãos que têm vindo a ser desenvolvidas gradualmente, microarquiteturas teciduais funcionalmente e estruturalmente organizadas *in vitro*<sup>9</sup>. No entanto, ainda existem aspetos técnicos de operacionalização que limitam ou precisam de ser superados para evidenciar o sucesso desta área<sup>9</sup>. Assim, há cerca de quinze anos surgiu uma técnica solucionadora para a produção de tecidos e, conseqüentemente órgãos vascularizados designada por bioimpressão<sup>7</sup>. Esta consiste na impressão de biomateriais a partir de imagens radiológicas com conversão e design de padrões e conjuntamente com células vivas com finalidade biológica e com o avanço tecnológico paralelamente associado, é possível posicionar células em materiais *Lbl* com elevado rendimento<sup>7</sup>. A engenharia surge assim como ferramenta para a produção de tecidos e órgãos 3D acoplado um sistema integrativo capaz de copiar os tecidos *in vivo*<sup>7</sup>. A partir de imagens 2D adquiridas por tomografia computadorizada, ressonância magnética e outras técnicas de imagiologia é possível realizar bioimpressões *Lbl* 3D<sup>7,23</sup>. Na globalidade ainda não existem técnicas definitivas para a produção de estruturas orgânicas 3D ideais porque, na impressão, os *Scaffolds Lbl* obtidos devem conferir um ambiente favorável à cultura celular 3D para que ocorram as interações

normais célula-célula e célula-MEC, no entanto, a bioimpressão permite obter tecido altamente reprodutível, o que se torna essencial para uma produção industrializada em massa<sup>7,23</sup>.

Para a aplicação dos tecidos e órgãos sintéticos *in vivo* é necessário a realização de testes de biocompatibilidade e, simultaneamente, realizar uma análise à capacidade de integração dos mesmos no hospedeiro recetor<sup>2</sup>. Para aplicações clínicas, os tecidos e órgãos 3D bioartificiais devem ser testados com o intuito de evitar a rejeição por parte do recetor (figura 2) e, desta forma, a sua imunogenicidade deve ser reduzida ao mínimo ao utilizar a FN de origem humana (de preferência do recetor) para *nanofilms* da MEC, assim como um meio de cultura celular ausente de agentes imunogénicos<sup>2</sup>. Um dos principais obstáculos que se ergue perante a aplicação de órgãos bioartificiais é a necessidade de um biorreator que satisfaça inteiramente as necessidades das células em cultura estimulando as suas funções, com a finalidade última de se obter tecido vascularizado funcional<sup>5,13,18,22</sup>. Para resolver este problema, têm sido estudadas algumas alternativas, nomeadamente através da engenharia tecidual que incita à utilização de linhas celulares derivadas de tumor<sup>17</sup>.

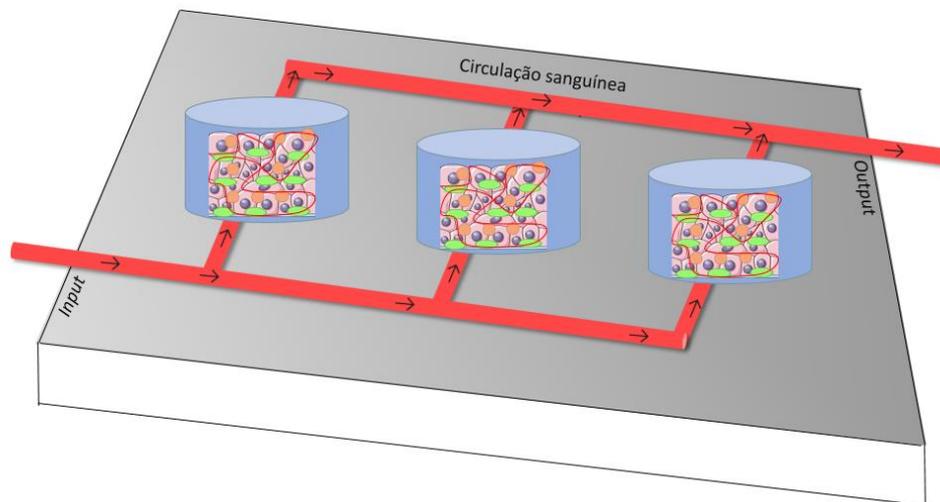


Figura 2: Modelo representativo da técnica que é utilizada para avaliar os efeitos do tecido 3D bioartificial produzido colocando em interação com este tecido plasma de recetores<sup>17,22</sup>.

## OBJETIVOS

- Descrever os principais tipos de tecnologia para a bioprodução 3D atualmente realizados.
- Demonstrar a importância das tecnologias de bioprodução 3D no futuro clínico.
- Retratar as principais aplicações médicas da engenharia de tecidos na prática clínica.

## METODOLOGIA

A presente revisão científica teve como metodologia a recolha e análise de artigos pesquisados na base de dados “Pubmed” utilizando essencialmente as palavras-chave em inglês *Scaffolds layer-by-layer*, *Bioprinting 3D*, *Inkjet bioprinter*, *Microextrusion bioprinter*, *Laser-assisted bioprinter* e

*Bioartificial tissues*. Os artigos selecionados para a execução do presente artigo situam-se temporalmente entre 2000 e 2018, pois um dos objetivos primordiais é perceber quais os principais métodos de bioprodução 3D atualmente realizados para a produção de tecidos/órgãos bioartificiais.

## TIPOS DE TECNOLOGIAS PARA BIOPRODUÇÃO 3D

Presentemente, existem diversos métodos que possibilitam a produção e síntese de construções orgânicas 3D nomeadamente os *Scaffolds Lbl*, mas poucos permitem uma produção tecnológica compatível com a célula e tecido<sup>7</sup>. Todo o envolvimento da MEC, propriedades mecânicas e estruturais, que inclui as porosidades e complexidades próprias e naturais associadas à célula, ao tecido e ao órgão é determinado por diversas técnicas que permitem obter uma impressão destas matérias orgânicas 3D bioartificiais<sup>7,23</sup>. Atualmente, a bioprodução por impressão a jato de tinta, microextrusão e por impressão assistida por laser são as tecnologias de produção e construção de tecidos e órgãos 3D bioartificiais mais avançadas (figura 3)<sup>7,9,23</sup>. Cada um destes métodos tem sido ampla e criteriosamente estudado, uma vez que apesar das vantagens que apresentam, ainda demonstram muitas lacunas interligando-se diretamente com as desvantagens apresentadas por cada um deles<sup>23</sup>.

## BIOIMPRESSÃO A JATO DE TINTA

A bioimpressão a jato de tinta foi introduzida no século XX e baseia-se num sistema de impressão por gotas permitindo a produção de material orgânico<sup>7</sup>. Esta é considerada uma técnica reprográfica baseada em dados de construções digitais em que, estruturalmente, aborda a técnica de *Scaffold Lbl*<sup>7</sup>. Assim, as *bioinks* usadas para a bioimpressão a jato de tinta inclui os *Scaffolds Lbl*, as células vivas humanas e outras substâncias biológicas, parte constituinte do tecido ou órgão<sup>7</sup>. O tamanho de uma gota impressa é da ordem da microescala, tendo em conta que esta corresponde diretamente a uma única célula<sup>7</sup>. A velocidade de impressão e o nível de resolução pode ser controlado eletronicamente e este método apresenta o mínimo de requisitos relacionados com a superfície de impressão<sup>7</sup>. Tendo por base as propriedades das *bioinks*, este sistema gera uma gama de viscosidades para os biomateriais 3D ainda muito limitada relacionado com o método de impressão utilizado<sup>7</sup>. Quanto maior a viscosidade e densidade celular do tecido ou órgão a ser produzido, maior a probabilidade de insucesso associado ao entupimento do dispensador da gota<sup>7</sup>. É fundamental que as gotas dispensadas difundam entre si momentaneamente, de forma a manter a integridade bioestrutural pretendida, evitando simultaneamente a distorção na forma e nas propriedades mecânicas das bioconstruções<sup>7</sup>. O processo de impressão das construções decorre, geralmente, à temperatura ambiente com o intuito de manter a viabilidade celular e funcional semelhante à que ocorre no organismo humano<sup>7,23</sup>.

Os principais atributos deste método, e que é importante referir, encontram-se associados à sua elevada rapidez e versatilidade na produção de qualquer tipo de tecido e, para além disso, é considerado um método economicamente rentável<sup>7,23</sup>. De entre as desvantagens, é importante realçar a falta de direccionalidade da gota de forma precisa, assim como o tamanho da mesma, já

que corresponde à produção de uma célula e, o entupimento do dispensador referido anteriormente<sup>23</sup>.

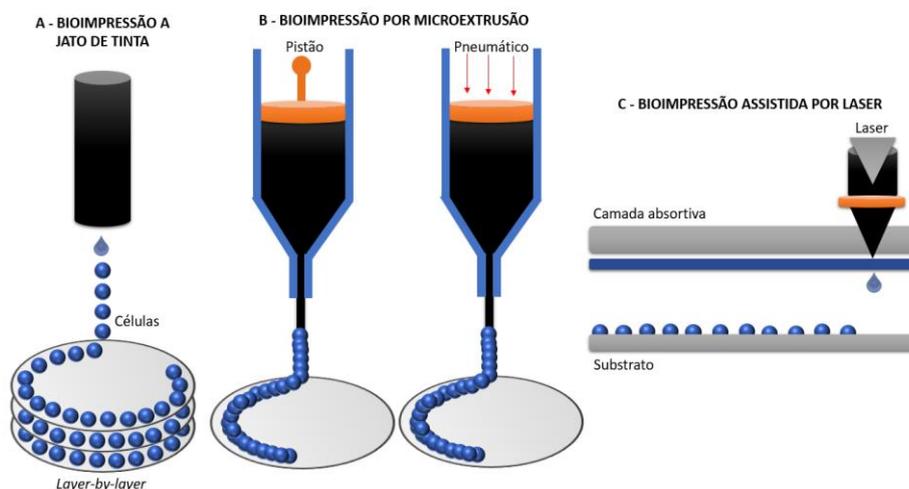


Figura 3: Esquema que apresenta os diferentes tipos de tecnologias de bioimpressão 3D. A – Bioimpressão a jato de tinta que forma *Scaffolds* pela impressão por gotas. B – Bioimpressão por microextrusão que usa a pressão gerada no pneumático ou pistão para libertar esferas ou filamentos contínuos de biomaterial através de um micro-bocal. C – Bioimpressão assistida por laser que utiliza energia laser em um substrato absorvente para gerar pressões que libertam biomateriais que contêm células em um substrato. Nas três técnicas é mantido um controle preciso dos eixos x, y e z para produzir tecidos e órgãos 3D bioartificiais<sup>7,8,9,25</sup>.

## BIOIMPRESSÃO POR MICROEXTRUSÃO

A bioimpressão por microextrusão é considerado um método de impressão contínuo, adequado à maioria das *bioinks* comumente utilizadas na síntese de tecidos e órgãos, abrangendo uma maior gama de viscosidades orgânicas<sup>7</sup>. A velocidade de impressão é controlada por uma pressão do tipo pneumático e, comparativamente com a bioimpressão a jato de tinta, esta produz grânulos contínuos de biomateriais que são depositados inicialmente em duas dimensões espaciais e, conseqüentemente, a obtenção da impressão dos hidrogéis são colocados *Lbl* formando estruturas 3D<sup>7,10,23,25</sup>. Esta permite ser aplicada a uma maior panóplia de biomateriais, como polímeros viscosos e encapsulados, assim como os hidrogéis que apresentam maior densidade celular<sup>7,11,23</sup>. Similarmente ao método descrito anteriormente, neste também ocorre o entupimento do dispensador no momento de dispensação de biomateriais a temperatura controlada quando apresenta diâmetros mais pequenos do orifício de saída, no entanto, diâmetros superiores também estão associados a resoluções de impressão menores<sup>7,23</sup>. A viabilidade celular está significativamente comprometida quando se aumenta a pressão de extrusão, assim, manter a viabilidade celular admissível e obter impressões celulares de elevada viscosidade durante o processo de impressão é considerado um dos maiores desafios à bioimpressão por extrusão<sup>7</sup>.

## BIOIMPRESSÃO ASSISTIDA POR LASER

A bioimpressão assistida por laser foi introduzida em meados do século XX com o intuito de criar padrões celulares<sup>7</sup>. É possível conceber uma similaridade deste método com uma máquina de

escrever convencional em que o seu princípio de funcionamento de bioimpressão incide na transferência direta induzida por laser<sup>7,23</sup>. Os principais componentes de um bioimpressor a laser consistem num feixe de laser com sistema de foco e uma placa alvo onde se encontra um coletor com lâmina de substrato<sup>7,23</sup>. Este método já apresenta também uma forma de apoio no transporte do dador que consiste numa fita, em que a camada superior é constituída por ouro ou titânio que absorve a energia emitida pelo feixe de laser e, na camada inferior apresenta a impressão dos biomateriais<sup>7,10,23</sup>. A resolução da bioimpressão assistida por laser depende, essencialmente, da energia emitida pelo feixe de laser, da espessura da camada e da distância entre camadas dadoras, do coletor e da viscosidade das *bioinks*<sup>7</sup>. No caso deste método, ao contrário do que se verifica nos métodos descritos anteriormente, não ocorre entupimento do dispensador porque não apresenta orifícios de saída, apresentando uma gama de produção alargada de viscosidades de tecidos ou órgãos<sup>7,23</sup>. A viabilidade celular obtida por impressão através deste método é considerada excelente logo após a deposição dos biomateriais, no entanto, as construções teciduais apresentam-se como de menor eficiência e, portanto, a necessidade, neste caso, de acoplar um biorreator bem idealizado<sup>7</sup>. Este paralelismo de metodologias ainda permanece em desenvolvimento, dada a elevada complexidade e os numerosos obstáculos técnicos<sup>7</sup>. Assim, a bioimpressão assistida por laser encontra-se limitada para a produção tecidual, no entanto a aplicação deste método em engenharia de tecidos inclui a produção e construção de pele num modelo de murganho, *in vivo*<sup>23</sup>. Esta experimentação pode ser o início para um avanço mais promissor no desenvolvimento e produção de tecidos.

## **APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DA BIOPRODUÇÃO 3D**

As técnicas de engenharia tecidual e de bioimpressão que permitem a produção e construção bioartificial de tecidos e órgãos 3D são bastante promissoras, tendo em conta, que pelo menos em termos teóricos, permitem imitar estrutural e funcionalmente porções anatómicas orgânicas.

Atualmente, numerosos tipos de tecidos estão sob investigação incluindo, mas não limitando, vasos sanguíneos, pele, cartilagem, osso, tecido cardíaco, hepático, pancreático e nervoso, entre outros, neste momento, com menor impacto<sup>7,10</sup>. As principais limitações de aplicabilidade centram-se na engenharia vascular e nervosa<sup>8</sup>. Em termos de estrutura dos vasos sanguíneos, as principais aplicações estão direcionadas a testes de previsão de taxas de fluxo, a pressão de oxigénio e à diferenciação de moléculas constituintes do sangue. No que diz respeito ao tecido cardíaco têm sido feitos testes essencialmente nas estruturas valvulares. As estruturas ósseas têm sido testadas essencialmente no que se refere à avaliação da proliferação celular e do funcionamento do tecido integrativo circundante, assim como, avaliar a geometria porosa e propriedades mecânicas. Os avanços aplicacionais no tecido hepático são os mais satisfatórios consistindo no transplante de fígados 3D bioartificiais em pacientes recetores que apresentem ressecção hepática parcial ou total, assim como, para deteção de toxicidade a drogas ou outro tipo de testes clínicos e biológicos. As aplicações direcionadas à pele bioartificial são essencialmente realizadas em casos de reparação de feridas funcionando como substitutos e, atualmente, está em estudo a fisiopatologia das doenças de pele.

Neste momento, o maior desenvolvimento encontra-se relacionado com aplicações comerciais destes tecidos para testes laboratoriais de triagem de drogas e testes de sensibilidade a estas<sup>7,17,18</sup>. O problema que se coloca em termos de aplicabilidade é a falta de inclusão ideal e eficaz de vasos sanguíneos que irriguem toda a estrutura dos tecidos e órgãos bioartificiais, ou seja, sem dúvida que o principal problema por resolver continua a ser a questão da irrigação das estruturas anatómicas não completa e não totalmente eficiente e, portanto, estabelece-se como a principal barreira ao nível da aplicação definitiva em termos clínicos<sup>6,7</sup>.

Assim, as técnicas de bioimpressão para construção de biomateriais 3D é, até agora, o principal ponto de esperança para o sucesso neste âmbito de produção de tecidos e órgãos 3D bioartificiais funcionais e vascularizados.

## CONCLUSÃO

As técnicas de engenharia tecidual e de bioimpressão descritas permitem a produção e construção de tecidos e órgãos 3D bioartificiais apresentando-se como bastante promissoras, tendo em conta que pelo menos em termos teóricos, permitem imitar estruturas anatómicas orgânicas.

As técnicas ancestrais e tradicionais de produção de tecidos e órgãos 3D bioartificiais que consistem numa cultura de células humanas associadas a *Scaffolds Lbl* porosos permitem obter tecido vascularizado quando acoplado a um biorreator que satisfaça plenamente as funções celulares e, assim obter tecido vascularizado e, em grande parte, funcional. São os hidrogéis naturais à base de gelatina e os fatores sintéticos utilizados que permitem um crescimento, uma proliferação e uma diferenciação celular conveniente. A circulação externa emparelhada a estes tecidos permite obter sistemas vasculares fomentando a estabilização e crescimento do tecido.

A tecnologia de bioprodução 3D apresentada tem atraído cada vez mais a atenção dos cientistas e engenheiros de tecidos para o contínuo estudo de produção de estruturas de suporte celular, tecidual e orgânico<sup>15</sup>. Existem diversas vantagens associadas a estes métodos referenciados que, de forma geral, permitem um controlo preciso, uma reprodutibilidade em grande escala, um design individual, uma construção estrutural eficaz, entre outras de menor relevância<sup>10</sup>. No entanto, ainda existem muitos entraves colocados a este tipo de métodos e muitos desafios nomeadamente no que se refere à construção bioartificial de tecidos complexos, que incluem vários tipos de células acoplados aos restantes constituintes normais do tecido e que permitam a produção de uma estrutura espacial 3D semelhante a um órgão reprodutível *in vivo*. Pelo facto destas técnicas fomentarem a incorporação de técnicas e estratégias de crescimento e desenvolvimento tecidual espacial, assim como de controlo do macro e micro-ambiente oferecem oportunidades para a produção de tecidos e órgãos consistentes e apresentando as suas principais características nativas<sup>20</sup>.

As tecnologias de bioimpressão usufruíram de um avanço considerável nos últimos anos e especula-se que assim continue. A bioimpressão por microextrusão supera relativamente aos restantes protocolos mencionados. Relativamente às técnicas de bioimpressão a jato de tinta e associada a laser encontram-se num nível inferior ao método anteriormente mencionado, no que diz respeito à obtenção de resultados orgânicos bem-sucedidos, devido às limitações associadas ao *software* e

*hardware* necessários e, aos danos celulares e efeitos vagarosos das técnicas apresentadas, respetivamente<sup>20</sup>.

Se a investigação e o esforço caminharem paralelamente e no mesmo sentido, espera-se que futuramente se obtenha a capacidade de produzir um órgão completamente *in situ*<sup>16</sup>, que existam bancos de tecidos e órgãos e uma forte possibilidade de melhorar a qualidade de vida dos pacientes que se encontrem com alguma condição de saúde menos favorável, colmatar a escassa biodisponibilidade de órgãos para transplantes e, conseqüentemente diminuir a infundável lista de espera dos pacientes para o efeito<sup>14</sup> que, infelizmente, muitas das vezes morrem antes da disponibilidade de um órgão compatível. Sem dúvida que esta é uma das maiores problemáticas em que a engenharia e tecnologia de tecidos e órgãos 3D bioartificiais pretende incidir, no entanto, as restantes vantagens adjacentes são também de extrema importância e já criam um impacto considerável em termos clínicos, porque já tem permitido realizar pequenos enxertos de tecidos artificiais, com o intuito de substituir zonas orgânicas danificadas, assim como a construção de estruturas anatómicas simples, como o nariz e as orelhas. Sem dúvida que a chave para o sucesso destas técnicas de produção de tecidos e órgãos se encontra na vascularização completa dos mesmos.

Com os avanços das tecnologias 3D modernas de bioimpressão, a era da produção de tecidos e órgãos consistentes específicos para pacientes está a chegar aos padrões clínicos e passará a ser um assunto debatido comumente em hospitais<sup>16,20</sup>.

## **DESAFIOS E PERSPETIVAS FUTURAS**

Está comprovado um notório avanço na engenharia tecidual e de órgãos inteiros e o uso de *Scaffold* da MEC para suporte biológico de tecidos e tem sido notavelmente bem-sucedida em uma variedade de aplicações clínicas, assim como um elevado grau de esforço científico e laboratorial para pesquisa e melhoria da produção e síntese dos diferentes tipos de matérias orgânicas 3D bioartificiais. No entanto, estão claramente impostos vários obstáculos a esta produção de estruturas 3D com alta resolução e elevado poder estrutural e funcional e a produção deste tipo de *Scaffolds* genéricos torna-se insuficiente em termos de aplicabilidade. Ainda não é possível prever, em futuro próximo, a produção de tecidos e órgãos 3D bioartificiais totalmente funcionais, no entanto, há um grande potencial de promessa para aplicação de novas tecnologias no campo da medicina de engenharia tecidual que o venha a possibilitar. Futuramente, as principais desvantagens a serem abordadas considera-se a falta de resistência estrutural mecânica, a integridade dos componentes e construtos produzidos associados aos biomateriais que estão sendo utilizados e, que trazem problemas associados à reprodução fiável da viscosidade do órgão e, portanto, incidir na melhoria dos biomateriais usados promovendo uma elevada viscosidade, tornando-se esta uma prioridade. Outra questão a ser colmatada prende-se com a melhoria da compreensão do microambiente em que os tecidos e órgãos, assim como a sua estrutura e função, que consiste num conjunto de esferas celulares tipificadas e, focar na resolução da escala micrométrica destes é fundamental para obter produções 3D bioartificiais mais bem-sucedidas. A questão foco é que o corpo não se cinge apenas a uma simples combinação celular, mas cada tecido apresenta um número considerável de células altamente especializadas inseridas numa matriz constituída por diversos compostos, o que a torna

também ela complexa. Ao regressar à origem da formação das primeiras células de um organismo, compreende-se que o mecanismo é extramente complexo e que é o resultado de muitos anos de evolução e, naturalmente ainda requer vários meses para gerar um organismo vivo completo. Assim, exigirmos a formação de tecidos e órgãos bioartificiais em dias ou semanas por bioimpressão é completamente compreensível o rumo a ser tomado por todas estas investigações e a necessidade de centralizar em formas de produzir tecidos com características diferentes em condições estéreis e a custos acessíveis.

## BIBLIOGRAFIA

1. AMANO, Y., NISHIGUCHI, A., MATSUSAKI, M., ISEOKA, H., MIYAGAWA, S., SAWA, Y., SEO, M., YAMAGUCHI, T., & AKASHI, M. (2016). DEVELOPMENT OF VASCULARIZED iPSC DERIVED 3D-CARDIOMYOCYTE TISSUES BY FILTRATION LAYER-BY-LAYER TECHNIQUE AND THEIR APPLICATION FOR PHARMACEUTICAL ASSAYS. *ACTA BIOMATERIALIA*, 33, 110-121. ACEDIDO EM [HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S1742706116300368?VIA%3DIHUB](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706116300368?via%3DIHUB).
2. ASANO, Y., SHIMODA, H., OKANO, D., MATSUSAKI, M., & AKASHI, M. (2015). TRANSPLANTATION OF THREE-DIMENSIONAL ARTIFICIAL HUMAN VASCULAR TISSUES FABRICATED USING AN EXTRACELLULAR MATRIX NANOFILM-BASED CELL-ACCUMULATION TECHNIQUE. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*, 11, 1303–1307. DOI: 10.1002/TERM.2108.
3. EISENSTEIN, M. (2015). ARTIFICIAL ORGANS: HONEY, I SHRUNK THE LUNGS. *NATURE*, 519, S16-18. DOI: 10.1038/519S16A.
4. FAULK, D. M., JOHNSON, S. A., ZHANG, L., & BADYLAK, S. F. (2014). ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN WHOLE ORGAN ENGINEERING. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, 229, 984-989. DOI: 10.1002/jcp.24532.
5. FIGARO, S., PEREIRA, U., RADA, H., SEMENZATO, N., POUCHOUIN, D., PAULLIER, P., DUFRESNE, M., & LEGALLAIS, C. (2017). OPTIMIZING THE FLUIDIZED BED BIOREACTOR AS AN EXTERNAL BIOARTIFICIAL LIVER. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS*, 40(4), 196-203. DOI: 10.5301/IJAO.5000567.
6. GAN, J., ZHOU, X., QIN, A., LUO, E., ZHAO, W., YU, H., & XU, J. (2005). HYBRID ARTIFICIAL LIVER SUPPORT SYSTEM FOR TREATMENT OF SEVERE LIVER FAILURE. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY: WJG*, 11(6), 890–894. DOI: 10.3748/wjg.v11.i6.890.
7. GAO, G., HUANG, Y., SCHILLING, A. F., HUBBELL, K., & CUI, X. (2018). ORGAN BIOPRINTING: ARE WE THERE YET?. *ADV. HEALTHCARE MATER*, 7, 1701018. DOI: 10.1002/adhm.201701018.
8. HUANG, Y., ZHANG, X., GAO, G., YONEZAWA, T., & CUI, X. (2017). 3D BIOPRINTING AND THE CURRENT APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING. *BIOTECHNOL. J.*, 12, 1600734. DOI: 10.1002/biot.201600734.
9. JANG, J. (2017). 3D BIOPRINTING AND IN VITRO CARDIOVASCULAR TISSUE MODELING. *BIOENGINEERING*, 4, 71. DOI: 10.3390/BIOENGINEERING4030071.
10. LI, J., CHEN, M., FAN, X., & ZHOU, H. (2016). RECENT ADVANCES IN BIOPRINTING TECHNIQUES: APPROACHES, APPLICATIONS AND FUTURE PROSPECTS. *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE*, 14, 271. DOI: 10.1186/s12967-016-1028-0.
11. MANDRYCKY, C., WANG, Z., KIM, K., & KIM, D. (2016). 3D BIOPRINTING FOR ENGINEERING COMPLEX TISSUES. *BIOTECHNOLOGY ADVANCES*, 34(4), 422-434. ACEDIDO EM [HTTP://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0734975015300665](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300665).
12. MATSUSAKI, M., CASE, C. P., & AKASHI, M. (2014). THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE TECHNIQUE AND PATHOPHYSIOLOGY. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 74, 95-103. ACEDIDO EM [HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0169409X14000040?VIA%3DIHUB](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X14000040?via%3DIHUB).
13. NAGAMORI, S., HASUMURA, S., MATSUURA, T., AIZAKI, H., & KAWADA, M. (2000). DEVELOPMENTS IN BIOARTIFICIAL LIVER RESEARCH: CONCEPTS, PERFORMANCE, AND APPLICATIONS. *JOURNAL GASTROENTEROLOGY*, 35, 493-503. DOI: 10.1007/s005350070071.

14. NICOLAS, C. T., HICKEY, R. D., CHEN, H. S., MAO, S. A., LOPERA HIGUITA, M., WANG, Y., & NYBERG, S. L. (2017). CONCISE REVIEW: LIVER REGENERATIVE MEDICINE: FROM HEPATOCYTE TRANSPLANTATION TO BIOARTIFICIAL LIVERS AND BIOENGINEERED GRAFTS. *STEM CELLS*, 35(1), 42-50. doi: 10.1002/STEM.2500.
15. NIGAM, S. K. (2013). CONCISE REVIEW: CAN THE INTRINSIC POWER OF BRANCHING MORPHOGENESIS BE USED FOR ENGINEERING EPITHELIAL TISSUES AND ORGANS?. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE*, 2, 993-1000. doi: 10.5966/SCTM.2013-0076.
16. PATRA, S., & YOUNG, V. (2016). A REVIEW OF 3D PRINTING TECHNIQUES AND THE FUTURE IN BIOFABRICATION OF BIOPRINTED TISSUE. *CELL BIOCHEM*, 74, 93. doi: 10.1007/s12013-016-0730-0.
17. SASAKI, K., AKAGI, T., ASAOKA, T., EGUCHI, H., FUKUDA, Y., IWAGAMI, Y., YAMADA, D., NODA, T., WADA, H., GOTOH, K., KAWAMOTO, K., DOKI, Y., MORI, M., & AKASHI, M. (2017). CONSTRUCTION OF THREE-DIMENSIONAL VASCULARIZED FUNCTIONAL HUMAN LIVER TISSUE USING A LAYER-BY-LAYER CELL COATING TECHNIQUE. *BIOMATERIALS*, 133, 263-274. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.034.
18. SELDEN, C., BUNDY, J., ERRO, E., PUSCHMANN, E., MILLER, M., KAHN, D., HODGSON, H., FULLER, B., GONZALEZ-MOLINA, J., LAY, A. L., GIBBONS, S., CHALMERS, S., MODI, S., THOMAS, A., KILBRIDE, P., ISAACS, A., GINSBURG, R., ILSLEY, H., THOMSON, D., CHINNERY, G., MANKAHLA, N., LOO, L., & SPEARMAN, W. (2017). A CLINICAL-SCALE BIOARTIFICIAL LIVER, DEVELOPED FOR GMP, IMPROVED CLINICAL PARAMETERS OF LIVER FUNCTION IN PORCINE LIVER FAILURE. *SCIENTIFIC REPORTS*, 7(1), 14518. doi: 10.1038/s41598-017-15021-4.
19. TAKEBE, T., SEKINE, K., ENOMURA, M., KOIKE, H., KIMURA, M., OGAERI, T., ZHANG, R., UENO, Y., ZHENG, Y., KOIKE, N., AOYAMA, S., ADACHI, Y., & TANIGUCHI, H. (2013). VASCULARIZED AND FUNCTIONAL HUMAN LIVER FROM AN iPSC-DERIVED ORGAN BUD TRANSPLANT. *NATURE*, 499, 481-484. doi: 10.1038/NATURE12271.
20. WANG, X., AO, Q., TIAN, X., FAN, J., WEI, Y., HOU, W., TONG, H., & BAI, S. (2016) 3D BIOPRINTING TECHNOLOGIES FOR HARD TISSUE AND ORGAN ENGINEERING. *MATERIALS*, 9, 802. doi: 10.3390/MA9100802.
21. YANNAS, I. V. (2004). SYNTHESIS OF TISSUES AND ORGANS. *CHEMBIOCHEM*, 5, 26-39. doi: 10.1002/CBIC.200300682.
22. ZHANG, S., CHEN, L., LIU, T., WANG, Z., & WANG, Y. (2014). INTEGRATION OF SINGLE-LAYER SKIN HOLLOW FIBERS AND SCAFFOLDS DEVELOPS A THREE-DIMENSIONAL HYBRID BIOREACTOR FOR BIOARTIFICIAL LIVERS. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE*, 25, 207-216. doi: 10.1007/s10856-013-5033-z.
23. ZHANG, X., & ZHANG, Y. (2015). TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS OF THREE-DIMENSIONAL BIOPRINTING. *CELL BIOCHEM BIOPHYS*, 72, 777-782. doi: 10.1007/s12013-015-0531-x.
24. ZHANG, Y. S., OKLU, R., DOKMECI, M. R., & KHADEMOSSEINI, A. (2017). THREE-DIMENSIONAL BIOPRINTING STRATEGIES FOR TISSUE ENGINEERING. *COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN MEDICINE*, 8(2), A025718. doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A025718.
25. ZHU, W., MA, X., GOU, M., MEI, D., ZHANG, K., & CHEN, S. (2016). 3D PRINTING OF FUNCTIONAL BIOMATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING. *CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY*, 40, 103-112. ACEDIDO EM [HTTP://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S0958166916300702](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166916300702).