

Avaliação de tecnologias e dispositivos para a bioimpressão 3D de tecidos aplicados à área médica

Evaluation of technologies and devices for 3D bioprinting of tissues applied to the medical field

Evaluación de tecnologías y dispositivos para bioimpresión 3D de tejidos aplicados al campo médico

DOI:10.34119/bjhrv7n2-475

Originals received: 03/29/2024

Acceptance for publication: 04/19/2024

Nilva de Karla Cervigne Furlan

Doutor em Applied of Molecular Oncology
Instituição: Faculdade de Medicina Jundiaí (FMJ)
Endereço: Jundiaí, São Paulo, Brasil
E-mail: nilvafurlan@g.fmj.br

Maria Clara Cypriano Diniz Barbosa

Graduanda em Medicina
Instituição: Faculdade de Medicina Jundiaí (FMJ)
Endereço: Jundiaí, São Paulo, Brasil
E-mail: maryclra20@gmail.com

Marcelo Glauco Moretto Junior

Graduando em Medicina
Instituição: Faculdade de Medicina Jundiaí (FMJ)
Endereço: Jundiaí, São Paulo, Brasil
E-mail: marcel.moretto@outlook.com

RESUMO

A tecnologia de bioimpressão 3D é uma tecnologia inovadora que possui diversas aplicabilidades na área da saúde. Na área médica, a bioimpressão 3D é utilizada para produção de peças cirúrgicas, implantações e produção de próteses, e para fabricação de tecidos e órgãos. O objetivo deste estudo foi destrinchar os dados acerca desta tecnologia e sua atual aplicabilidade na área médica. O método consistiu na condução de uma revisão bibliográfica da literatura sobre as tecnologias de bioimpressão 3D na área de ciências da saúde, de acordo com os parâmetros determinados pela declaração PRISMA. Os resultados da revisão demonstraram que a tecnologia tem sido bastante inovadora e importante para o avanço de pesquisas na área médica, porém ainda apresenta alguns entraves para sua implementação na prática clínica como a nutrição tecidual, contaminação de amostra e alguns fatores de expressão dos tecidos. Assim, pode-se afirmar que o tecido bioimpresso é eficiente, uma vez que se assemelha muito bem ao tecido humano. Os estudos de toxicidade em relação a drogas, de investigação de microambiente tecidual e tumoral são de extrema relevância para futuramente gerar tratamentos personalizados e individualizados, melhorando assim a terapia de diversas doenças. Em conclusão, nossa pesquisa demonstrou que os avanços na área de impressão

tridimensional permitiram que a tecnologia fosse capaz de imprimir tecidos biológicos vivos e funcionais, de extrema relevância na aplicabilidade médica.

Palavras-chave: bioimpressão 3D, células, tecidos, medicina.

ABSTRACT

3D bioprinting technology is an innovative technology that has several applications in the health sector. In the medical field, 3D bioprinting is used for the production of surgical parts, implants and prosthetic production, and for the manufacture of tissues and organs. The objective of this study was to unravel the data about this technology and its current applicability in the medical field. The method consisted of conducting a bibliographic review of the literature on 3D bioprinting technologies in the area of health sciences, in accordance with the parameters determined by the PRISMA declaration. The results of the review demonstrated that the technology has been quite innovative and important for the advancement of research in the medical field, however it still presents some obstacles to its implementation in clinical practice, such as tissue nutrition, sample contamination and some tissue expression factors. Thus, it can be said that bioprinted tissue is efficient, as it closely resembles human tissue. Drug toxicity studies and tissue and tumor microenvironment investigations are extremely important to generate personalized and individualized treatments in the future, thus improving the therapy of various diseases. In conclusion, our research demonstrated that advances in the area of three-dimensional printing have allowed the technology to be capable of printing living and functional biological tissues, which are extremely relevant in medical applicability.

Keywords: 3D bioprinting, cell culture, medicine, engineering tissue.

RESUMEN

La tecnología de bioimpresión 3D es una tecnología innovadora que tiene varias aplicaciones en el sector de la salud. En el campo médico, la bioimpresión 3D se utiliza para la producción de piezas quirúrgicas, implantes y producción de prótesis, y para la fabricación de tejidos y órganos. El objetivo de este estudio fue desentrañar los datos sobre esta tecnología y su aplicabilidad actual en el campo médico. El método consistió en realizar una revisión bibliográfica de la literatura sobre tecnologías de bioimpresión 3D en el área de las ciencias de la salud, de acuerdo con los parámetros determinados por la declaración PRISMA. Los resultados de la revisión demostraron que la tecnología ha sido bastante innovadora e importante para el avance de la investigación en el campo médico, sin embargo, todavía presenta algunos obstáculos para su implementación en la práctica clínica, como la nutrición de tejidos, la contaminación de muestras y algunos factores de expresión de tejidos. Por lo tanto, se puede decir que el tejido bioimpreso es eficiente, ya que se asemeja mucho al tejido humano. Los estudios de toxicidad farmacológica y las investigaciones de tejidos y microambientes tumorales son extremadamente importantes para generar tratamientos personalizados e individualizados en el futuro, mejorando así la terapia de diversas enfermedades. En conclusión, nuestra investigación demostró que los avances en el área de la impresión tridimensional han permitido que la tecnología sea capaz de imprimir tejidos biológicos vivos y funcionales, que son extremadamente relevantes en la aplicabilidad médica.

Palabras clave: Bioprinting 3D, cultivo celular, medicina, tejido de ingeniería.

1 INTRODUÇÃO

Por definição tem-se que a bioimpressão 3D é uma tecnologia que envolve a utilização de componentes biológicos como células, para a manufatura de tecidos e órgãos complexos presentes nos seres vivos. Isso se dá a partir do trabalho conjunto da engenharia de produção e materiais e a área biológica, possibilitando a formação de programas capazes de guiar a máquina de bioimpressão para a formação dos produtos biológicos¹. Para tanto existe um método composto por três etapas: pré-processamento, processamento e pós-processamento. Nessas etapas ocorre a idealização do material a ser produzido, logo são necessários conhecimentos prévios acerca do órgão ou tecido desejado, a histologia e a anatomia que podem ser adquiridos a partir de exames de imagem por exemplo com a reconstrução 3D em computadores a partir de uma ressonância magnética¹. Em seguida, ocorre a bioimpressão em si, com a programação dos equipamentos, escolha do biomaterial e montagem da peça e por fim faz-se a comparação entre o produto idealizado e o realizado, sendo que nessa fase utiliza-se scanners e softwares como ferramentas para otimização do trabalho e biorreatores que tem por função a estimulação da célula para a diferenciação desta e assim permitir o seu funcionamento como daquele órgão inicialmente pensado¹.

Para a utilização dessa tecnologia, os materiais devem ser biocompatíveis, isto é, substâncias combinadas ou não que possuem aplicações biomédicas e possuem um efeito semelhante ao tecido original considerando o ambiente orgânico e o efeito do material no organismo ². Para tanto, o material para ser ideal não deve desencadear uma resposta do organismo, deve permitir a regeneração ou restabelecimento do sítio de implantação do tecido original e não deve formar produtos tóxicos ao organismo, entre outras propriedades ². Ou seja, o biomaterial deve oferecer alta integridade, estabilidade e ser insolúvel no meio a fim de que o produto mantenha sua forma e integridade para a qual foi projetado, além de ser de importância comercial a fácil produção desse ².

Em geral, as vantagens da bioimpressão 3D são diversas, apresentando grande aplicabilidade na área médica tanto de forma direta, com a produção de biomateriais a serem utilizados nos pacientes, como na forma indireta a partir da construção de materiais para o treinamento de profissionais para um cirurgia por exemplo². No entanto possuem diversas desvantagens, entre elas a própria instabilidade do material em que um desafio para a viabilidade dos órgãos é a formação de uma rede para vascularização, sendo inicialmente a impressão a partir de uma estrutura porosa que permite a circulação dos nutrientes como o oxigênio pela peça ².

Existem algumas técnicas presentes hoje no mercado que possibilitam à impressão 3D vantagens em relação ao desenvolvimento da ciência e aplicabilidades em diversas áreas de conhecimento³. Inicialmente, tem-se a impressão 3D por extrusão que utiliza do princípio de forçar filamentos contínuos para deposição sob uma placa através de um sistema com temperatura controlada, sendo suas vantagens a impressão de bio tintas e materiais viscosos, porém como necessita de alta pressão pode danificar facilmente um material biológico³. Outra técnica é a bioimpressão por gotejamento em que a deposição do material ocorre através de um sistema térmico induzido por corrente³. Já na técnica por jato de tinta, há uma pressão térmica ou mecânica atuante na deposição do material sob a placa. A principal vantagem é a alta resolução e alta velocidade, no entanto afeta a sobrevivência celular devido ao choque térmico existente. Por fim, a bioimpressão a laser em que se utiliza tecnologias de feixes de ondas que aquece e induz o material por um feixe localizado. Suas vantagens incluem alta resolução e desvantagem, a lentidão do processo³.

As aplicações na medicina para a impressão 3D são diversas com atuação na área cirúrgica com o desenvolvimento de moldes específicos e individualizados para cada paciente, incrementando qualidade aos pacientes⁴. Ou seja, inicialmente utiliza-se de imagens recolhidas de exames como tomografia computadorizada para a moldagem da peça de acordo com as proporções reais do paciente. Em seguida, cria-se o molde com a bioimpressão a partir de materiais não biológicos a fim de guiar o cirurgião nos procedimentos cirúrgicos como na reconstrução de crânio com próteses após craniectomias descompressivas⁵. Também pode-se utilizar tal tecnologia para aprimorar o conhecimento médico ao demonstrar de forma tridimensional uma estrutura complexa, como modelos embriológicas para uso didático⁶.

Para a bioimpressão 3D, hoje, envolve a perspectiva de diversas áreas como a medicina regenerativa com o desenvolvimento de moldes celulares através da utilização de células-tronco. Logo, estudos demonstraram que a utilização das biotintas na formação de arcabouços celulares possibilitaram sucesso nas perspectivas do desenvolvimento e diferenciação celular *in vitro*⁷. Em pesquisas com células neurais e células-tronco de glioma para modelo de tumor cerebral, o modelo de glioma bioimpresso em 3D fornece uma nova ferramenta para estudo da gliomagenese⁸. Já outras áreas de estudo com tecidos osteomusculares, tem-se que os métodos de bioimpressão atualmente possuem dificuldades para a formação de estruturas capazes de satisfazer os valores mecânicos do tecido ósseo humano e fornecer a rigidez necessária para complementação e implantação⁹. Além disso, pesquisas com células estromais mesenquimais humanas para a construção de multicamadas, utilizando como base o hidrogel composto de atelocolágeno e ácido hialurônico, demonstrou capacidade regenerativa para a reconstrução de

tecido osteocondral nas articulações do joelho de animais. Esse estudo pôde corroborar com o potencial de uma construção de multicamadas impressa em 3D para regeneração de tecidos heterogêneos¹⁰.

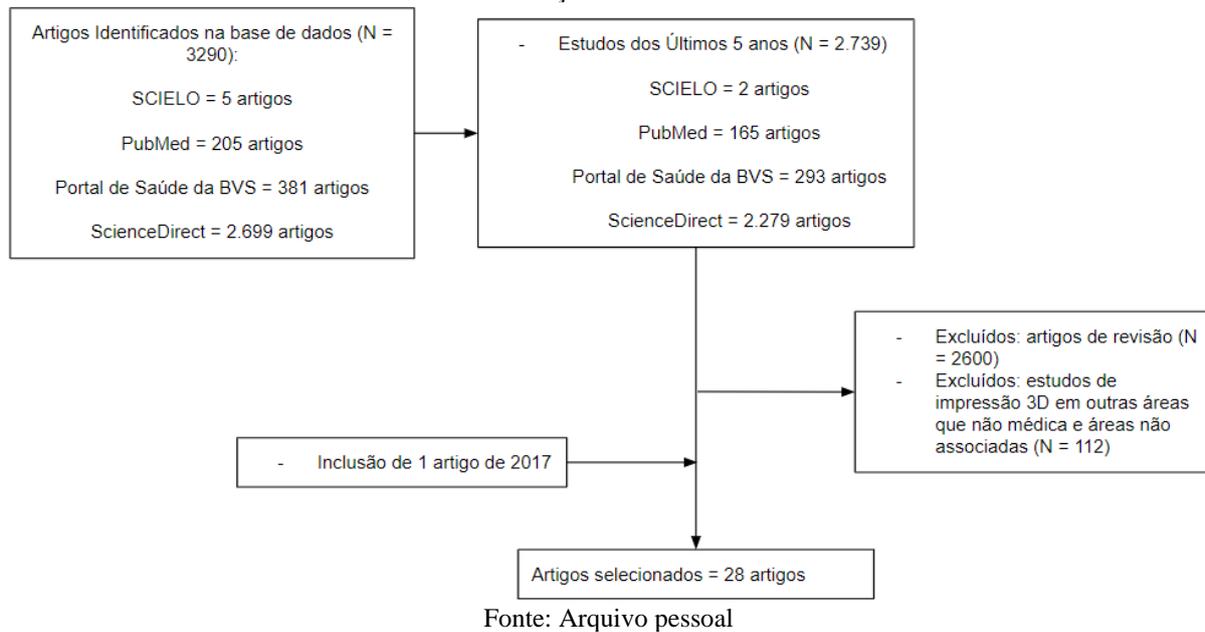
As aplicações médicas para a bioimpressão 3D são diversas e possuem grande importância científica e social ao passo que aprimoram e benePRISMA e foi realizado inicialmente a partir da utilização dos seguintes termos “Impressão 3D”, “Bioimpressão” e “Medicina” para trabalhos publicados em periódicos indexados ficam as modalidades de tratamentos médicos existentes. Assim, o presente estudo objetiva revisar a literatura atual sobre a tecnologia da bioimpressão 3D, e analisar a aplicabilidade dessa tecnologia e de suas perspectivas para o futuro na área médica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para a realização da revisão da literatura com levantamento de dados sobre as tecnologias de bioimpressão 3D de órgãos e tecidos aplicada à área médica envolveu a pesquisa exploratória dos tópicos abordados. O estudo seguiu as etapas de uma metanálise, de acordo com a declaração de PRISMA, que foi realizada a partir da utilização dos seguintes termos: “Impressão 3D”, “Bioimpressão” e “Medicina” para trabalhos publicados em periódicos indexados, disponíveis nas bases de dados PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), SCIELO (<https://scielo.org/pt/>), Porta Regional da BVS (<https://bvsalud.org/>) e ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>). Para esta última base dados mencionada, os descritores utilizados foram “Bioimpressão na medicina” e “Órgãos e tecidos” (Figura 1).

Os filtros marcados para a seleção dos trabalhos foram: artigos originais, realizados em humanos e/ou animais e publicados nos últimos 5 anos (2018-2022). Os estudos que foram considerados elegíveis deveriam atender os seguintes critérios de inclusão: estudos de que utilizavam a tecnologia de impressão 3D na área médicas ou associadas, relatos de caso, cartas ou editoriais, estudos com amostras ou protótipos experimentais todos na área médica em humanos. Os critérios de exclusão adotados foram: artigos de revisão da literatura, estudos de impressão 3D em outras áreas que não médica e áreas não associadas, como na área de medicina veterinária. Os estudos identificados na literatura com relação à tecnologia em questão, mas que não preencheram todos os critérios de inclusão para o presente estudo também foram excluídos (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma do processo de seleção do estudo, formulado de acordo com os critérios de PRISMA para a realização de metanálise.



3 RESULTADOS

A seleção dos artigos e organização dos mesmos foram adicionados a uma tabela que considera os autores, o material de estudo e os resultados obtidos como recursos para a análise da aplicabilidade da tecnologia da bioimpressão 3D na área médica atualmente (Table 1).

Atualmente, os estudos pré-clínicos em relação a essa tecnologia incluem o desenvolvimento do material em diferentes situações de bioimpressão com alteração dos parâmetros de impressão para avaliação da viabilidade celular, testagem de componentes celulares expressos nas células bio impressas, testagem de drogas sob a bioimpressão principalmente em tumores, entre outras.

Sobre o estudo da estrutura da bioimpressão, seus parâmetros e entraves, de acordo com Trucco D, Aarushi S, Manferdini C, Gabusi E, Petretta M, Desando G, et al., a modelagem e exploração dos componentes celulares é promissora na abordagem de tecidos vivos na medicina regenerativa, a análise dos parâmetros como pressão de extrusão, velocidade de impressão, tamanho da agulha é essencial para a prever parâmetros ideais para maximizar a fidelidade das construções fabricadas aos parâmetros de projetos bioimpressos¹⁴. Os modelos analíticos são importantes para a contribuição na redução do número de etapas experimentais e consumo de materiais e métodos em relação aos resultados finais a fim de evitar perdas pós-impressão¹⁴. Além disso, segundo Swathi N, Parikshit B, Chih YL, Su SL, Che WL, Che WW, et al., o estudo de materiais envolve a perspectiva de diferentes fórmulas de biotinta que têm impacto

diferente na composição e vitalidade final das células, como a composição de ácido hialurônico e junção desse material com outros químicos que em geral podem auxiliar o sucesso das amostras³¹. Em um estudo realizado por Tijore A, Irvine SA, Sarig U, Mhaisalkar P, Baiana V, Venkatraman S, et al., foi possível a pesquisa da diferenciação celular e suporte da funcionalidade tal qual observado na bioimpressão de células miocárdicas que suportam a contratilidade características dessas células, sendo reportada a capacidade de estudo da toxicidade de substâncias nesse tipo celular devido ao sucesso na construção celular de cardiomiócitos³². No estudo feito por Mollica PA, Booth-Creech EN, Reid JA, Zamponi M, Sullivan SM, Palmer XL em organóides e tumoróides 3D bioimpressos visou a pesquisa de novas interações celulares e moleculares únicas com o desenvolvimento biomiméticos in vitro de doenças complexas, podendo, dessa forma, auxiliar em melhorias de confiabilidade das descobertas laboratoriais e promover maior taxa de cura do paciente com a doença¹⁷. Assim, segundo um estudo feito em uma co-cultura câncer-macrofágica por Heinrich MA, Heinrich L, Ankone MJK, Vergauwen B, Prakash J, é crucial que seja também estudado o microambiente desenvolvido, haja vista que pode-se encontrar nesse ambiente fatores que impactam negativamente a formação de uma boa arquitetura biocompatível, tal qual contaminação de endotoxinas, que muitas vezes estão presentes nos biomateriais. Essa contaminação causa forte reação inflamatória em macrófagos e inibe os efeitos da cultura celular, podendo alterar significativamente a comunicação entre e intercelular além da eficácia de substâncias, gerando uma má interpretação da potência e segurança dos compostos testados³⁷.

Em relação a outras áreas de estudo, a área da medicina oncológica também é extremamente promissora tanto para o estudo da microarquitetura tumoral como para o desenvolvimento de tratamento individualizado. O estudo da celularidade tumoral sobre o câncer de mama realizado por Wang Y, Mirza S, Wu S, Zeng J, Shi W, Band H, et al. , por exemplo, obteve sucesso na produção de modelos asseados em hidrogéis principalmente na análise da transição epitelial mesenquimal e sua relação com hipóxia celular²⁵. Assim, observou-se que a hipóxia diminui tamanho e densidade do conjunto celular e promoveu transição epitelial para mesenquimal sem afetar a viabilidade celular, validando o modelo para a examinar o comportamento das células cancerígenas em diferentes estágios de progressão e a avaliar a eficácia terapêutica dos inibidores da via da hipóxia para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra o câncer de mama²⁵. Já para outros tipos de tumor como o carcinoma hepatocelular, no estudo de Feihu X, Lejia S, Yuan P, Gang X, Bao J, Haifeng X, et al., se mostrou um modelo in vitro fiel e confiável para cultura de longa duração, usado para prever

drogas específicas para cada paciente a partir da impressão de células retiradas do próprio paciente, podendo individualizar o tratamento¹⁵.

Com isso, de acordo com o estudo de Abu Awwad HAM, Thiagarajan L, Kanczler JM, Amer MH, Bruce G, Lanham S, et al., de estruturas bioimpressas em 3D para reparo ósseo e todos os outros estudos demonstrados, a bioimpressão 3D tem grande potencial para ser uma tecnologia amplamente utilizada no tratamento personalizado, sendo esses estudos vitais para novas classes terapêuticas e diferentes aplicabilidades¹⁶.

Tabela 1. Comparação entre os procedimentos de bioescrita 3D e os modelos atualmente disponíveis na área médica.

Autores	Métodos e objetivos	Modelos/Resultados
Bagatin JT, Camarena DEM, Osaki LH, et al. ¹¹ (2023)	Cultura de células da epiderme humana (M-RHE e B-RHE)	A comparação dos modelos manual e bio-impresso resultou em epidermes para a análise de função de barreira sem diferenças significativas, dentro dos critérios de aceitação. Os testes de irritação cutânea da OCDE não foram significativamente diferentes, mas a maior viabilidade foi do tecido bio impresso. Em relação à resposta inflamatória, observou-se a exacerbação dessa resposta na epiderme bioimpressão.
Kiryaly L, Shah NC, Abdullah O, Al-Ketan O, et al. ¹² (2021)	Uso de impressão 3D para planejamento cirúrgico de 15 pacientes que apresentavam anomalias cardíacas congênitas.	Analisou-se o benefício do uso de protótipos desenhados em impressora 3D a partir de imagens anatômicas retiradas de tomografias computadorizadas a fim de aprimorar a precisão cirúrgica em casos complexos de anomalias cardíacas, o que resultou em um alto grau de rendimento e permitiu maior planejamento da abordagem cirúrgica.
Quílez C, Cerdeira E, González-Rico J, et al. ¹³ (2022)	Geração de esferóides contendo fibroblastos dérmicos humanos usando diferentes métodos de fabricação.	Na pesquisa, as culturas de esferóides mais relevantes incluem o método da gota suspensa e a placa, os quais possuem mais baixo custo. Com relação a bioimpressão, há uma contribuição potencialmente para o aumento da produção e padronização, No entanto, a sedimentação celular impulsionada pela gravidade dentro da seringa de extrusão, surgiu como uma limitação, assim para aumentar a homogeneidade do meio foi estudada a adição de ácido hialurônico a fim de aumentar a viscosidade e complementar a biotinta.
Li L, Shi J, Ma K, Jin J, Wang P, et al. ¹⁴ (2021)	Seleção de seis mini porcos machos divididos em dois grupos para estudo de reparo ósseo utilizando uma impressora 3D de manipulação robótico	O uso da tecnologia de bioimpressão 3D in situ para reparo enfrenta enormes desafios, com uma grande hiato entre a pesquisa básica e a aplicação clínica, incluindo a síntese de biomateriais, estruturação com formas semelhantes a defeitos e desenvolvimento de uma bioimpressora 3D apropriada, além da biocompatibilidade da bio-tinta. Ao contrário do método terapêutico tradicional, a tecnologia de bioimpressão 3D in situ pode economizar tempo de preparação, resultando em reabilitação precoce e menos complicações pós-operatórias.
Truco D, Sharma A, Manferdini C, et al. ¹⁵ (2021)	Extração de fibroína de seda e utilização na composição de biotinta para análise de parâmetros orgânicos em células estromais mesenquimais humanas incorporadas. Comparação entre duas biotintas: SF-G e A3G7.	Foi observado que se a velocidade de impressão for muito baixa em relação à velocidade do fluxo de material para sair da agulha, muito material é extrudado e as estruturas não definidas podem ser impressas. Além disso, o uso de agulhas mais longas acarretava em erros maiores devido a maiores taxas de cisalhamento interno.
Xie F, Sun L, Pang Y, et al. ¹⁶ (2021)	Análise de cultura de células de carcinoma hepatocelular desenvolvidas por bioimpressão.	Os modelos utilizados a partir da bioimpressão são confiáveis na cultura a longo prazo e capazes de analisar a previsão de drogas específicas para o tratamento individualizado de cada paciente. Isso foi possível devido a permanência das características dos carcinomas parenterais após a impressão, como também mantiveram a expressão de biomarcadores e as alterações genéticas iniciais.

Abu Awwad HAM, Thiagarajan L, Kanczler JM, et al ¹⁷ (2020)	Fabricação de células mesenquimais humanas através da bioimpressão e combinação de encapsulamento da proteína GET-RUNX2 ativa em um material imprimível	Foi observada a adesão, a proliferação e a diferenciação efetivas nas células mesenquimais, confirmando também a citocompatibilidade. Com a combinação de fatores genéticos capazes de expressar moléculas que auxiliam como fatores osteogênicos, favorecendo assim a formação óssea e desfavorecendo a diferenciação para linhagens celulares especializadas em produção de colágeno e tecido adiposo
Mollica P A, Booth-Creech E N, Reid J A, et al ¹⁸ (2019)	Coleta de tecido mamário humano e animal (ratos) para análise da combinação da bioimpressão com hidrogel para confecção de matriz extracelular de tecido mamário.	Tanto a matriz gerada pelas células humanas quanto as de rato possibilitaram a avaliação da estruturação formada, a diferenciação celular e principalmente a sinalização pela produção de diferentes substâncias ou proporções diferentes que pudessem distinguir claramente as amostras. Além disso, também foi examinado o conceito de usar uma glândula mamária descelularizada como substrato de cultura para células epiteliais da mama e células de câncer de mama.
Huotilainen E, Salmi M, Lindahl J. ¹⁹ (2019)	Paciente do sexo masculino que apresentava defeito osteocondral do côndilo femoral	Devido a utilização da tomografia computadorizada foi possível obter com precisão as dimensões do paciente e estimar com especificidade as necessidades cirúrgicas e assim planejar de forma personalizada o tratamento.
Liu B, Li J, Lei X, et al ²⁰ (2020)	Biotinta composta por alginato de sódio, gelatina, cloreto de cálcio, citrato de sódio e nanossílica e adição de células tronco mesenquimais da medula óssea para a construção de tecido ósseo e análise na cicatrização óssea em ratos.	Com a adição de nanossílica observou-se um aumento da resolução da estrutura bioimpressão e melhorou a capacidade de impressão, diminuindo a resistência ao fluxo, o que protegeu as células de danos devido a tensão de cisalhamento. Observou-se alta taxa de viabilidade celular nas amostras que foi relacionada ao alto grau de hidratação e à porosidade dos hidrogéis nanocompósitos. Além disso, houve uma melhor recuperação do tecido nos ratos, em amostras em que foi utilizada a nanossílica em comparação às outras.
Rostam-Alilou AA, Jafari H, Zolfagharian A, Serjouei A, Bodaghi M. ²¹ (2022)	Enxertos de membrana timpânica impressa em 3D, fabricados em 2 tipos arquitetônicos e utilizando 3 tipos de material.	Houve uma boa relação entre a acústica do enxerto de membrana timpânica modelados por meio da bioimpressão in vitro e os modelos computacionais em movimento do domínio da frequência e padrões de velocidade. Com os resultados satisfatórios, pode-se inferir que existe potencial para o modelo bioimpresso ser utilizado em timpanoplastia.
Mao Q, Wang Y, Li Y, et al ²² (2020)	Microtecido projetado a partir da bioimpressão de biotintas carregadas de hepatócitos baseadas em matriz extracelular descelularizada de fígado a fim de melhorar o funcionamento celular.	A presença da matriz extracelular descelularizada em biotintas aumenta o crescimento, a migração, a disseminação e a manutenção da função hepática. Além disso, o efeito dessa matriz diminuiu o tempo de cura da biotinta usada, levando a melhor fidelidade do tecido. O desenvolvimento dessas biotintas podem fornecer maior eficácia funcional específica do fígado para produtos de engenharia de tecidos.
Addario G, Djudjaj S, Fare S, Boor P, Moroni L, Mota C. ²³ (2020)	Estabelecimento de um protocolo para isolamento de células renais primárias e testar sua capacidade de bioimpressão e no isolamento de células tubulares de camundongos.	Houve sucesso no isolamento celular com boas taxas de viabilidade celular e de atividade metabólica. No entanto, a amostra de células de linhagem endotelial obteve um crescimento limitado quando cultivadas em meio específico analisado, podendo ser explicada pela falta de um fator de expressão que aumentaria esse parâmetro. Assim, devem ser adicionados outros componentes que viabilizaram a formação da arquitetura renal, podendo levar a estudos que utilizem o modelo de túbulos e interstício renais.
Lewicki J, Bergman J, Kerins C, Hermanson O. ²⁴ (2019)	Bioimpressão de células de neuroblastoma humano em hidrogel utilizando uma técnica com pasta de gelatina para suporte dístico durante a impressão a partir do uso de um índice de otimização de parâmetros	Observou-se uma diferença significativa na sobrevivência celular ao usar diferentes pressões com correlação positiva entre a pressão aplicada e a porcentagem de células vivas. Assim, o sucesso de determinada aplicação de bioimpressão depende da otimização de todos os componentes do sistema em questão. Logo, foi sugerido o uso do índice de otimização como um meio para encontrar parâmetros positivos para a aplicação final a longo prazo.
Seah T, Wong WL, Beh C ²⁵ (2022)	Utilização de fibras de sacrifício que são encapsuladas dentro da estrutura impressa para quando removidas deixarem canais que permitem a criação de uma rede de circulação.	Os resultados do estudo demonstraram que mesmo com o sucesso na viabilidade celular após a impressão, houve uma queda desta quando analisada a superfície do modelo executado. Porém, os resultados obtidos com o uso das fibras de sacrifício foram promissores, demonstrando alta capacidade de difusão pelas estruturas hiperporosas. Assim, combinando as tintas sacrificiais com nossa

		biotinta granular, é possível criar estruturas de vasos hierárquicos que podem fornecer nutrientes às células de maneira eficaz.
Wang Y, Mirza S, Wu S, et al. ²⁶ (2018)	Análise dos efeitos da hipóxia em culturas de células de mama cancerígenas no modelo de desenvolvido por bioimpressão 3D.	Foram analisadas as duas linhagens em condição de hipóxia e demonstrado que as células isogênicas primárias tinham maior capacidade de migração, além da maior produção de LOX. Os modelos baseados em hidrogéis podem ser utilizados para estudar o comportamento das células do câncer de mama em diferentes estágios de progressão do tumor e avaliar a eficácia terapêutica dos inibidores da via da hipóxia para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra o câncer de mama.
Maxson EL, Young MD, Noble C, et al. ²⁷ (2019)	Análise da biocompatibilidade e do potencial da biotinta à base de colágeno e células tronco mesenquimais de ratos alo gênicos para uso como implante cardíaco in vivo.	A implantação dos modelos das válvulas cardíacas nos animais foi bem sucedida com relação a remodelação, que incluiu as fases de reabsorção, síntese, estabilização e remodelamento. No entanto, foi observado a formação de processos inflamatórios nas amostras com aumento de CD3 por exemplo.
Li L, Yu F, Shi J, Shen S, Teng H, Yang J, Wang X, Jiang Q ²⁸ (2017)	Uso de digitalização e impressão 3D para tratamento de defeitos ósseos e tecidos lesionados.	Ocorreu a reparação satisfatória das peças previamente planejadas utilizando a bioimpressão 3D. Para isso foram usados polímeros compatíveis de alginato que são de escolha satisfatória juntamente com o componente PEGDA que forma composto elástico e resistente além de poroso, ideal para a modelagem do tecido.
Tang M, Xie Q, Gimple R, Zhong Z, et al. ²⁹ (2020)	Uso da tecnologia da bioimpressão 3D para a produção de tumor de glioblastoma e análise do microambiente tumoral e testagem de drogas para tratamento da doença.	O modelo de tumor cerebral 3D expressou assinaturas de resposta de hipóxia, permitindo a investigação da sinalização hipóxica em ambiente fisiológico. Nesse sentido, há possibilidade da investigação de interações tumor e sistema imune em um sistema compatível com espécies humanas. Isso pode facilitar a compreensão das interações imunológicas específicas, fornecendo informações relevantes para a imunoterapia.
Ma K, Zhao T, Yang L, Wang P, et al. ³⁰ (2020)	Análise da superfície da região defeituosa, cor, integridade, contorno e qualidade do reparo a partir da seleção de uma população de coelhos selecionados.	As características biomecânicas e bioquímicas <i>in situ</i> do grupo de bioimpressão e o grupo de implantação de hidrogel foram semelhantes, indicando que o processo de fabricação de hidrogel <i>in vitro</i> pode ser omitido sob certas condições. Os resultados sugeriram que a tecnologia de bioimpressão 3D <i>in situ</i> é altamente apropriada para reparar lesões.
Lawlor KT, Vanslbrouck LM, Higgins JW, et al. ³¹ (2021)	Análise da bioimpressão por extrusão para automatizar a geração de organóides renais com variedades de linhas celulares, incluindo células-tronco pluripotentes humanas.	A complexidade celular e a morfologia do tecido foram reproduzidas em organóides bio impressos gerados usando uma variedade de números e conformações iniciais de células. A bioimpressão de organóides aumentou o rendimento da fabricação ao mesmo tempo em que forneceu alto controle de qualidade em relação ao número, diâmetro e viabilidade celular.
Nedunchezian S, Banerjee P, Lee C, et al. ³² (2021)	Desenvolvimento de biotintas com uso de células-tronco de tecido adiposo com o objetivo de reparação e regeneração de cartilagem danificada	O hidrogel composto desenvolvido possibilitou a segregação de quantidades maiores de genes marcadores condrogênicos em comparação a biotinta apenas de ácido hialurônico. Logo, as células-tronco derivadas de tecido adiposo carregadas com o hidrogel 3D HBSAC formaram uma estrutura que alcançou diferenciação condrogênica bem-sucedida.
Tijore A, Irvine SA, Saring U, Mhaisalkar P, Baiana V, Venkatraman S ³³ (2018)	Uso de uma gelatina reticulada em bio impressora 3D com composição de células de linhagem miocárdica para estudo da morfologia celular formada, alongamento e adesão focal.	As aplicações desta abordagem podem ser benéficas para a criação de sistema cardíaco <i>in vitro</i> para estudos fisiológicos e de cardiotoxicidade. O estudo promoveu a formação de um scaffold de hidrogel microcanal produzido por bioimpressão 3D, induzindo a diferenciação miocárdica de células-tronco, assim como suporte de crescimento e a contratilidade dos cardiomiócitos.
Idaszek, J., Volpi, M., Paradiso, A., et al. ³⁴ (2021)	Análise do desenvolvimento de duas biotintas para bioimpressão de células de tecido pancreático produtoras de insulina.	Foi observado aumento da secreção de insulina após estimulação com glicose e formação de estruturas semelhantes <i>in vitro</i> , e potencial propriedade angiogênica <i>in vivo</i> em membrana corioalancóide de galinha.

Yu, H., Gong, W., Mei, J., et al. ³⁵ (2022)	Scaffold de pele preparado com paeoniflorina-alginato de sódio (SA) gelatina para tratamento de feridas diabéticas em ratos aleatoriamente escolhidos.	O fragmento de pele com 3% de paeoniflorina-alginato de sódio (SA) gelatina promoveu boa cicatrização das feridas, maior deposição de colágeno e regeneração, sugerindo sucesso no tratamento de feridas diabéticas.
García-Lizarribar A, Villasante A, Lopez-Martin JA, et al. ³⁶ (2023)	Desenvolvimento de bio tinta de tecido muscular para avaliação da funcionalidade muscular e perda de massa a partir do uso de células de camundongos e humanos	A fabricação do modelo bio impresso com as peculiaridades da biofísica estipulada na pesquisa resultou em um material com sucesso na diferenciação e proliferação celular. Esse modelo recapitula algumas características observadas no músculo esquelético de pacientes que sofrem caquexia por ação cancerígena em modelo vivos. Assim, é possível que a arquitetura proposta seja relevante para o estudo de doenças musculares e ação de medicamentos e drogas na mesma.
Wang M, Xu N, Tang R, Liu X. ³⁷ (2022)	Bioimpressão 3D de osteossarcoma em análise in vitro.	O modelo de osteossarcoma bioimpressão resultou em um notável potencial de remodelamento da matriz extracelular e na sua expressão, considerando a relação com análises do comportamento do tumor in vivo. O modelo de osteossarcoma proposto destacou a viabilidade do nicho do tumor e teria ampla aplicabilidade para estudos de desenvolvimento do tumor, terapia direcionada e triagem de drogas.
Heinrich MA, Heinrich L, Ankone MJK, Vergauwen B, Prakash J. ³⁸ (2023)	Bioimpressão de células cancerígenas de tecido mamário e macrófagos para estudo dos efeitos de altos níveis de endotoxinas	O estudo mostra que a contaminação por endotoxinas em biomateriais pode alterar a comunicação intercelular e, logo, a eficácia da droga, o que pode levar a uma má interpretação da potência e segurança dos compostos testados. Com o aumento do uso de modelos 3D in vitro para avaliar novas terapêuticas antes de iniciar estudos em animais, os pesquisadores devem estar cientes dos potenciais efeitos interferentes das endotoxinas em seus modelos, o que pode levar à má interpretação dos resultados ou, no pior dos casos, a falha de experimentos in vivo.

¹ Informações coletadas a partir dos dados selecionados para pesquisa.

Fonte: Arquivo pessoal¹

4 DISCUSSÃO

A impressão e bioimpressão 3D apresenta extensa aplicabilidade na área médica, embora ainda pouco explorada clinicamente e cirurgicamente em seres humanos. Essa tecnologia pode contribuir para o planejamento e otimização de cirurgias, avaliando a arquitetura anatômica de forma a auxiliar o planejamento cirúrgico tal como vias de entrada e procedimentos intraoperatórios, orientações e esclarecimento de dúvidas para os pacientes que serão submetidos a cirurgias, precisão na colocação e estruturação de próteses e regeneração de estruturas biológicas corporais (como cartilagens)¹².

Inicialmente a Impressão 3D é uma tecnologia com boa aplicabilidade médica, haja vista sua facilidade no uso e avanços técnicos que permitem a saída do plano pré-clínico para o clínico. Dessa forma, as próteses ou modelos anatômicos a serem utilizados são formados a partir dados brutos da angiografia por TC foram transformados da forma digital para a manual, mantendo a conformação anatômica e proporcional do paciente¹². Estudos relataram a boa precisão e eficiência da técnica de impressão para planejamento cirúrgico em áreas de procedimentos ortopédicos que levaram em consideração defeitos osteocondrais em

pacientes¹³. Baseado nos estudos de exames de imagem previamente realizados, foi possível a boa manufatura da peça que contribuiu com sucesso do resultado cirúrgico¹³.

Os resultados da bioimpressão 3D tem grande potencial para a aplicação médica na medicina regenerativa. Os modelos de pele, por exemplo, obtiveram sucesso na replicação de estruturas epidérmicas semelhantes às encontradas na epiderme humana, principalmente na estratificação da pele¹¹. O estudo da discriminação de correta de substâncias e classificação de irritantes e não irritantes indica que a bioimpressão pode ser de grande contribuição à automatização da reconstrução de modelos epidérmicos, podendo assim ter impacto positivo nas pesquisas que utilizam essa tecnologia para o modelo de epiderme¹¹. Embora tenha sido verificado que a epiderme bioimpressa tende a intensificar a resposta inflamatória, é uma alternativa viável para esses estudos.

Na área da otorrinolaringologia, por exemplo, observou-se uma correlação satisfatória entre as propriedades acústicas de enxertos de membrana timpânica simulados e os resultados encontrados nos testes experimentais feitos com o modelo *in vitro*²¹. As potenciais aplicações são na timpanoplastia que consistem em enxertos da membrana timpânica, sendo a criada a partir da bioimpressão qualificada biomecanicamente para um potencial uso nessa enxertia²¹.

A tecnologia da bioimpressão também já está sendo utilizada em estudos pré-clínicos de modelos animais. Alguns experimentos de enxerto ósseo em animais demonstraram sucesso cirúrgico com potencial para economizar semanas de preparação pré-operatória, com reabilitação precoce e menos complicações pós-operatórias¹⁴. Além disso, o tempo operatório diminuiu consideravelmente, quando comparado à cirurgia usualmente realizada, deixando o paciente menos tempo sob anestesia, diminuindo a dependência de um cirurgião e reduzindo a exposição dos materiais estéreis¹⁴. Também foi obtido sucesso nas pesquisas em que houve digitalização e bioimpressão, foram realizadas de maneira rápida e os enxertos foram precisos, sendo benéfico nos casos estudados em modelos de ratos²⁸ e em modelos de coelhos, que no caso foi importante para a reparação de tecido cartilaginoso, podendo ser mais eficaz em alguns casos especiais³⁰. No entanto, alguns entraves dessa tecnologia são a grande lacuna existente entre a pesquisa básica e a aplicação clínica, incluindo a síntese de biomateriais, estruturação com formas semelhantes a defeitos e desenvolvimento de uma bioimpressora 3D apropriada, além da biocompatibilidade da bio-tinta que é a base para essa tecnologia e os métodos de estruturação que em geral requerem altas temperaturas e concentrações iônicas não fisiológicas, sendo, às vezes, incompatíveis com o organismo¹⁴.

Outras pesquisas no mesmo campo mostram outros desafios como nos materiais atuais de bioimpressão, no geral, há baixa resistência mecânica, baixa capacidade osteoindutora e falta

de microambiente adequado para células carregadas²⁰. No entanto, a Nanosilicato (nSi) se mostra promissora, com alta biocompatibilidade, degradada em produtos atóxicos e com propriedades osteoindutoras, usada para bioimpressão óssea²⁰. Adição de nSi à biotinta promoveu melhor capacidade de impressão e aumentou a resistência mecânica, tornando possível o desenvolvimento de tecidos ou órgãos funcionais em escala humana²⁰. No estudo, a biotinta se tornou citocompatível e osteoindutora, além de quando incorporada com nSi foi útil para testes de drogas ou para carregar drogas antimurais em scaffold para substituição de tumores ósseos ressecados²⁰.

Para o tratamento de feridas diabéticas, também foi investigado em animais, a eficácia de um scaffold de pele de paeoniflorina-alginato de sódio (SA)-gelatina³⁵. Os scaffold de pele de paeoniflorina-SA-gelatina a 3% impresso usando tecnologia de impressão 3D biológica, em comparação a outras concentrações estudadas, promoveu o reparo de feridas diabéticas em um modelo de rato, promovendo a deposição de colágeno e a formação microvascular, reduzindo a inflamação a partir da capacidade de prevenção da infiltração inflamatória, sugerindo que esse scaffold biológico da pele pode ser ideal para o tratamento de feridas diabéticas³⁵.

Em geral, a bioimpressão hoje é uma tecnologia que ainda precisa ser aprimorada a fim de que sua aplicabilidade no mercado médico seja eficiente e disponível. Atualmente, os estudos pré-clínicos em relação a essa tecnologia incluem o desenvolvimento do material em diferentes situações de bioimpressão com alteração dos parâmetros de impressão para avaliação da viabilidade celular, testagem de componentes celulares expressos nas células bio impressas, testagem de drogas sob a bioimpressão principalmente em tumores entre outras. A modelagem e exploração dos componentes celulares é promissora na abordagem de tecidos vivos na medicina regenerativa, a análise dos parâmetros como pressão de extrusão, velocidade de impressão, tamanho da agulha é essencial para a prever parâmetros ideais para maximizar a fidelidade das construções fabricadas aos parâmetros de projetos bioimpressos¹⁵. Os modelos analíticos são importantes para a contribuição na redução do número de etapas experimentais e consumo de materiais e métodos em relação aos resultados finais a fim de evitar perdas pós-impressão¹⁵.

Além disso, o estudo de materiais envolve a perspectiva de diferentes fórmulas de biotinta que têm impacto diferente na composição e vitalidade final das células, como a composição de ácido hialurônico e junção desse material com outros químicos que em geral podem auxiliar o sucesso das amostras³². Assim, é possível a pesquisa da diferenciação celular e suporte da funcionalidade tal qual observado na bioimpressão de células miocárdicas que suportam a contratilidade características dessas células. Nesse estudo, foi reportada a capacidade de análise

de toxicidade de substâncias nesse tipo celular devido ao sucesso na construção celular de cardiomiócitos³³. Assim, a tecnologia permite futuramente a possibilidade de implantação dos modelos bioimpressos *in vivo* em pacientes que necessitem de terapia específica²⁵. Na medicina regenerativa, há pesquisas envolvendo células musculares, principalmente para perda de massa muscular em que observou-se a fabricação rápida e automatizada dessas células podendo ter aplicabilidade *in vivo* além de facilitar estudos de doenças musculares a partir de estruturas mais preditivas e fidedignas da amostra original específica dos pacientes³⁶.

A respeito do desenvolvimento dos materiais celulares, diversas pesquisas atuam sobre a impressão dos tecidos de forma a estudar os parâmetros utilizados e/ou os componentes de viabilidade celular como a expressão celular, o crescimento e diferenciação. Em estudos sobre os métodos de impressão, os esferóides são capazes de produzir um bom ambiente nativo de organismo vivo, aumentando a confiabilidade e a reprodutividade da amostra¹³. Assim, foi possível nesse sentido a produção padronizada e escalável de esferóides celulares, juntamente com a introdução de componentes não orgânicos que auxiliaram a sedimentação e logo a viabilidade dessas células testadas¹³. Entre os diversos parâmetros estudados, observou-se que a presença de matriz extracelular descelularizada em biotintas aumentou o crescimento, a migração, a disseminação celular e a manutenção da função celular, no caso de células hepáticas²². Além disso, o efeito dessa matriz diminuiu o tempo de cura da biotinta usada, possibilitando maior eficácia funcional específica do fígado para produtos de engenharia de tecidos²². Já em outro estudo de modelagem de células renais, houve sucesso no isolamento e nas taxas de viabilidade e atividade metabólica com geração rápida e alto rendimento, sendo passível a manipulação de parâmetros de padronização e uniformização para geração de controle de qualidade³⁰. No entanto, há dificuldade observada em relação à linhagem endotelial da amostra que obteve crescimento limitado²³. Isso pode ser explicado pela falta dos fatores de expressão, concluindo que seriam necessários a adição de outros componentes constituintes para melhor viabilidade da amostra²³. Outros estudos da tecnologia aplicada em células pancreáticas demonstraram potencial *in vitro* da secreção de substâncias hormonais como a insulina, porém potencial angiogênico *in vivo* em membrana corioalancóide de galinha³⁴. A diferença na sobrevivência celular pode também ser explicada pela pressão aplicada e porcentagem de células vivas em que há dependência da otimização de todos os componentes do sistema bioimpresso, sendo importante um índice para auxiliar as técnicas de viabilidade e integridade do uso dessa tecnologia²⁶.

Um dos entraves importantes da bioimpressão é a capacidade de nutrição do tecido, não ocorre formação de vascularização do tecido, por isso a arquitetura bioimpressa é pequena e

final. Para superar essa problemática foi estudada a elaboração de uma estrutura de escala centimétrica que possuía canais de fibra de sacrifício, não havendo fluxo de nutrientes, mas persistindo viável por alguns dias e também uma biotinta granular fotorreticulável que visava a otimização do abastecimento das células a partir de um material de suporte²⁵. Essa biotinta é capaz de produzir uma estrutura hiper porosa que permitia o fluxo de conteúdo de nutrição para as células, tendo essa estrutura sucesso na nutrição celular²⁵.

Em relação a outras áreas de estudo, a área da medicina oncológica também é extremamente promissora tanto para o estudo da microarquitetura tumoral como para o desenvolvimento de tratamento individualizado. O estudo da celularidade tumoral sobre o câncer de mama por exemplo, obteve sucesso na produção de modelos baseados em hidrogéis principalmente na análise da transição epitelial mesenquimal e sua relação com hipóxia celular²⁶. Assim, observou-se que a hipóxia diminui tamanho e densidade do conjunto celular e promoveu transição epitelial para mesenquimal sem afetar a viabilidade celular, validando o modelo para a examinar o comportamento das células cancerígenas em diferentes estágios de progressão e a avaliar a eficácia terapêutica dos inibidores da via da hipóxia para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra o câncer de mama²⁶. Outros estudos, visam a pesquisa de novas interações celulares e moleculares únicas com o desenvolvimento biomiméticos *in vitro* de doenças complexas, podendo, dessa forma, auxiliar em melhorias de confiabilidade das descobertas laboratoriais e promover maior taxa de cura do paciente com a doença¹⁸. Já para outros tipos de tumor como o carcinoma hepatocelular, se mostrou um modelo *in vitro* fiel e confiável para cultura de longa duração, usado para prever drogas específicas para cada paciente a partir da impressão de células retiradas do próprio paciente, podendo individualizar o tratamento¹⁶. Enquanto para osteossarcomas, os modelos propostos apresentaram boa viabilidade e recapitulam um nicho tumoral *in vitro* semelhante ao *in vivo*³⁷. Com isso, tem-se grande potencial para ser uma tecnologia amplamente utilizada no tratamento personalizado, em implantes ósseos, sendo esses estudos vitais para novas classes terapêuticas¹⁷. No entanto, é crucial que seja também estudado o microambiente desenvolvido, haja vista que pode-se encontrar nesse ambiente fatores que impactam negativamente a formação de uma boa arquitetura biocompatível, tal qual contaminação de endotoxinas, que muitas vezes estão presentes nos biomateriais. Essa contaminação causa forte reação inflamatória em macrófagos e inibe os efeitos da cultura celular. Assim, a contaminação por endotoxinas pode alterar significativamente a comunicação entre e intercelular além da eficácia de substâncias, podendo assim gerar uma má interpretação da potência e segurança dos compostos testados³⁸.

5 CONCLUSÕES

A bioimpressão é um ramo da engenharia de biomateriais que vem ganhando muito espaço no campo na pesquisa e interesse sobre sua aplicabilidade médica nos ramos clínicos, farmacológicos e cirúrgicos. Diversos estudos sobre o impressão 3D de biomateriais resultaram em possíveis usos que envolveram culturas *in vitro*, *in vivo*, próteses, enxertos e regeneração tecidual. Deve-se reiterar que, atualmente, ainda existem barreiras na aplicabilidade e reprodutibilidade da bioimpressão, como a presença de endotoxinas que dificultam a criação de culturas, tecidos ou próteses que se comportem de maneira exata aos tecidos humanos, podendo haver divergências farmacológicas e de comportamento celular. Além disso, a biocompatibilidade histológica dos materiais impressos ainda é um tópico muito relevante em diversos estudos, como a viabilidade da vascularização e nutrição dos tecidos bio impressos, assim como novos métodos de se realizar a impressão e o funcionamento da bioimpressora 3D propriamente dita, como a extrusão, formação da arquitetura histológica bioimpressão e seus componentes envolvendo tamanho de filamento, velocidade e pressão de extrusão entre outros.

No geral, apresenta-se muito promissora, com novas descobertas que gradativamente elucidam métodos para que a bioimpressão se torne automatizada, de fácil manuseio e adaptação às finalidades médicas, com aditivos que se demonstraram úteis para a viabilidade *in vitro* e *in vivo* de alguns compostos.

REFERÊNCIAS

1. OLIVEIRA NA, ROBALLO KCS, LISBOA AFS, et al. Bioprinting with stem cells and production of mini-organs. *Pesq. Vet. Bras.* 2017;37(9)
2. VAZ Guilherme. Estudo sistemático sobre o cenário da tecnologia de bioimpressão 3D. 2020, 103 f. Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/204673/vaz_g_me_arafcf_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y
3. ZHANG J, WEHRLE E, RUBERT M, MULLER R. 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr; 22(8): 3971. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/3971>
4. SOUTO RRDS, MENDES RP, NETO OJA, SILVA SFF, FLORÊNCIO MF, MESSIAS IMO and MESSIAS JB. Utilização da impressora 3D para confecção de um modelo de blastocisto. *Brazilian Journal of Health Review.* 2021 nov/dez, v.4, n.6, p. 28179-28185
5. MARICEVICH P, CAMPOLINA AC. Skull reconstruction with PMMA customized prostheses after decompressive craniectomies. *Rev Bras Cirurgia Plástica.* 2017; 32(1). Available from: <http://www.rbcp.org.br/details/1812/pt-B>
6. LACERDA TF, ROMANIELO AFR, GOMES SM, SOUZA JKL, CARVALHO VCS, MACHADO LCS, CHAVES ACH and MARTINS ACL. Aplicabilidade da impressora 3D na prática médica contemporânea 3D printer applicability in contemporary medical practice. *Braz. J. Hea. Rev.* 2020 jan./fev. v.3, n.1, p.620-625. ISSN 2595-6825
7. SKELDON G, LUCENDO-VILLARIN B, SHU W. Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018 Jul 5; 373(1750): 20170224.
8. DAI X, Ma C, LAN Q, XU T. 2016. Células-tronco de glioma bioimpressas em 3D para modelo de tumor cerebral e aplicações de suscetibilidade a drogas. *Biofabricação* 8, 45005 (10.1088/1758-5090/8/4/045005)
9. POTYONDY T, UQUILLAS JA, TEBON PT, et al. Recent advances in 3D bioprinting of musculoskeletal tissues. *Biofabrication.* 2021 Mar 10; 13(2): 10.1088/1758-5090/abc8de. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/abc8de>
10. SHIM JH, JANG KM, HAHN SK, PARK JY, JUNG H, OH K, PARK KM, YEOM J, PARK SH, KIM SW, WANG JH, KIM K, CHO DW. Bioimpressão tridimensional de construções multicamadas contendo células estromais mesenquimais humanas para regeneração de tecido osteocondral na articulação do joelho de coelho. *Biofabricação*, 8 (2016) 014102.
11. BAGATIN JT, CAMARENA DEM, OSAKI LH, et al. Bioprinted and manual human epidermis production: A compared performance for skin irritation tests. *Bioprinting.* 2023 feb;29; e00251.

12. KIRALY L, SHAH NC, ABDULLAH O, AL-KETAN O, et al. Three-Dimensional Virtual and Printed Prototypes in Complex Congenital and Pediatric Cardiac Surgery-A Multidisciplinary Team-Learning Experience. *Biomolecules*. 2021 Nov 16;11(11):1703.
13. QUÍLEZ C, CERDEIRA E, GONZÁLEZ-RICO J, et al. Evaluation of different methodologies for primary human dermal fibroblast spheroid formation: automation through 3D bioprinting technology. *Biomed Mater*. 2022 Jul 1;17(5).
14. LI L, SHI J, MA K, JIN J, WANG P, et al. Robotic *in situ* 3D bio-printing technology for repairing large segmental bone defects. *Journal of Advanced Research*. 2021 may; 30; Pages 75-84.
15. TRUCO D, SHARMA A, MANFERDINI C, et al. Modeling and Fabrication of Silk Fibroin-Gelatin-Based Constructs Using Extrusion-Based Three-Dimensional Bioprinting. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Jul 12;7(7):3306-3320.
16. XIE F, SUN L, PANG Y, et al. Three-dimensional bio-printing of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine. *Biomaterials*. 2021 Jan;265:120416.
17. ABU Awwad HAM, THIAGARAJAN L, KANCZLER JM, et al. Genetically-programmed, mesenchymal stromal cell-laden & mechanically strong 3D bioprinted scaffolds for bone repair. *Journal of Controlled Release*. 2020 September; 325; Pages 335-346.
18. MOLLICA PA, BOOTH-CREECH EN, REID JA, et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels. *Acta Biomater*. 2019 Sep 1;95:201-213.
19. HUOTILAINEN E, SALMI M, LINDAHL J. Three-dimensional printed surgical templates for fresh cadaveric osteochondral allograft surgery with dimension verification by multivariate computed tomography analysis. *Knee*. 2019 Aug;26(4):923-932.
20. LIU B, LI J, LEI X, et al. 3D-bioprinted functional and biomimetic hydrogel scaffolds incorporated with nanosilicates to promote bone healing in rat calvarial defect model. *Materials Science and Engineering: C*. 202 July; 112;110905.
21. ROSTAM-ALILOU AA, JAFARI H, ZOLFAGHARIAN A, SERJOUEI A, BODAGHI M. Experimentally validated vibro-acoustic modeling of 3D bio-printed grafts for potential use in human tympanic membrane regeneration. *Bioprinting*. 2022 mar ;25:e00186.
22. MAO Q, WANG Y, LI Y, et al. Fabrication of liver microtissue with liver decellularized extracellular matrix (dECM) bioink by digital light processing (DLP) bioprinting. *Materials Science and Engineering: C*. 2020 apr;109; 110625.
23. ADDARIO G, DJUDJAJ S, FARE S, BOOR P, MORONI L, MOTA C. Microfluidic bioprinting towards a renal *in vitro* model. *Bioprinting*. 2020 dec;20:e00108.
24. LEWICKI J, BERGMAN J, KERINS C, HERMANSON O. Optimization of 3D bioprinting of human neuroblastoma cells using sodium alginate hydrogel. *Bioprinting*. 2019;16:e00053.
25. SEAH T, WONG WL, BEH C. Vascularization strategies for bioprinting. *Materialstoday: proceedings*. 2022;70;pages 638-642.

26. WANG Y, MIRZA S, WU S, et al. 3D hydrogel breast cancer models for studying the effects of hypoxia on epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2018 Aug 14; 9(63): 32191–32203.
27. MAXSON EL, YOUNG MD, NOBLE C, et al. In vivo remodeling of a 3D-Bioprinted tissue engineered heart valve. *Bioprinting*. 2019 dec;16:e00059.
28. LI L, YU F, SHI J, SHEN S, TENG H, YANG J, WANG X, JIANG Q. *In situ* repair of bone and cartilage defects using 3D scanning and 3D printing. *Sci Rep*. 2017 aug; 7:9416.
29. TANG M, XIE Q, GIMPLE R, ZHONG Z, et al. Three-dimensional bioprinted glioblastoma microenvironments model cellular dependencies and immune interactions. *Cell Res*. 2020 Oct; 30(10): 833–853.
30. MA K, ZHAO T, YANG L, WANG P, et al. Application of robotic-assisted *in situ* 3D printing in cartilage regeneration with HAMA hydrogel: An *in vivo* study. *J Adv Res*. 2020 May; 23: 123–132.
31. LAWLOR KT, VANSLBROUCK LM, HIGGINS JW, et al. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation. *Nat Mater*. 2021 Feb;20(2):260-271
32. NEDUNCHEZIAN S, BANERJEE P, LEE C, et al. Generating adipose stem cell-laden hyaluronic acid-based scaffolds using 3D bioprinting via the double crosslinked strategy for chondrogenesis. *Materials Science and Engineering: C*. 2021 May;124; 112072.
33. TIJORE A, IRVINE SA, SARING U, MHAISALKAR P, BAIANA V, VENKATRAMAN S. Contact guidance for cardiac tissue engineering using 3D bioprinted gelatin patterned hydrogel. *Biofabrication*. 2018 Jan 12;10(2):025003.
34. IDASZEK, J., VOLPI, M., PARADISO, A., et al. Alginate-based tissue-specific bioinks for multi-material 3D-bioprinting of pancreatic islets and blood vessels: A step towards vascularized pancreas grafts. *Bioprinting*. 2021 dec;24:e00163.
35. YU, H., GONG, W., MEI, J., et al. The efficacy of a paeoniflorin-sodium alginate-gelatin skin scaffold for the treatment of diabetic wound: An *in vivo* study in a rat model *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 jul;151; 113165.
36. GARCÍA-LIZARRIBAR A, VILLASANTE A, LOPEZ-MARTIN JA, et al. 3D bioprinted functional skeletal muscle models have potential applications for studies of muscle wasting in cancer cachexia. *Biomaterials Advances*. 2023jul;150; 213426
37. WANG M, XU N, TANG R, LIU X. A 3D-printed scaffold-based osteosarcoma model allows to investigate tumor phenotypes and pathogenesis in an *in vitro* bone-mimicking niche. *Materials Today Bio*. 2022 jul;15;100295.
38. HEINRICH MA, HEINRICH L, ANKONE MJK, VERGAUWEN B, PRAKASH J. Endotoxin contamination alters macrophage-cancer cell interaction and therapeutic efficacy in pre-clinical 3D *in vitro* models. *Biomaterials Advances*. 2023 jan;144; 213220.