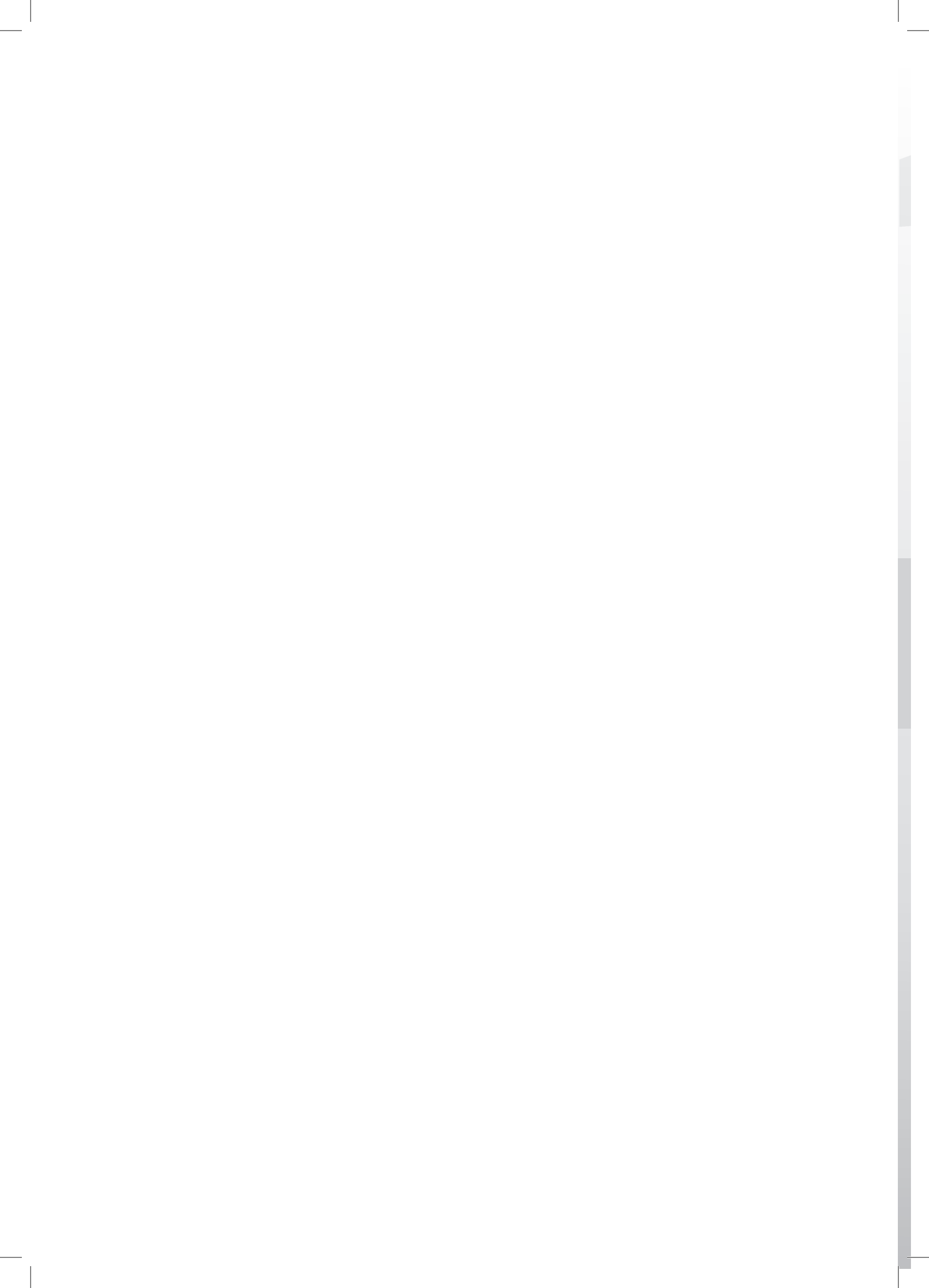


relatórios de pesquisa

Foresight em 3D/4D Bioprinting

Fabio Batista Mota
Luiza Braga



relatórios de pesquisa

Foresight em 3D/4D Bioprinting

Fabio Batista Mota¹

Luiza Braga²

(1) Doutor em Economia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e
Coordenador dos Estudos de Foresight do CEE-Fiocruz

(2) Doutoranda em Economia pela Universidade Federal Fluminense (UFF) e
Pesquisadora da Equipe de Estudos Prospectivos do CEE-Fiocruz

Ministério da Saúde – MS

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Nísia Trindade Lima – Presidente

Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz – CEE-Fiocruz

Antônio Ivo de Carvalho – Coordenador

Coordenação editorial

Fernando Manuel Bessa Fernandes

Comunicação

Eliane Bardana Chvili

Equipe de Estudos Prospectivos do Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz

Fabio Batista Mota

Roseli Monteiro

Bernardo Cabral

Luiza Braga

Kamaiaji Castor

Leonardo Moutinho

Samara Alvarez Alves

Capa, projeto gráfico e editoração eletrônica

Tatiana Lassance Proença

Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil 4036 – 10º Andar – Manguinhos
21040-361 – Rio de Janeiro/RJ – Brasil
Tel.: 55 21 3882-9133
cee@fiocruz.br

Sumário Executivo

- Este relatório apresenta os resultados do estudo de *Foresight* em 3D/4D *bioprinting* realizado pela área de Estudos Prospectivos do CEE-Fiocruz.
- Este estudo teve por objetivo gerar informação qualificada sobre o futuro das tecnologias 3D/4D *bioprinting* nos campos médico e biomédico. A ênfase foi dada à possibilidade das tecnologias 3D/4D *bioprinting* fornecerem tecidos e órgãos humanos para implante, pesquisa e testes de toxicidade.
- Neste relatório, 3D/4D *bioprinting* abrange os termos 3D *printing*, 3D *bioprinting*, 4D *printing* e 4D *bioprinting*. A tecnologia de 3D *printing*, também conhecida como fabricação aditiva, tem a capacidade de produzir objetos físicos tridimensionais baseados em modelos digitais por meio da sucessão de camadas de materiais. Essa tecnologia refere-se à impressão de sistemas biológicos e funcionais utilizando células e biomateriais. A quarta dimensão (4D) é o tempo e envolve o uso de materiais inteligentes que respondem a estímulos externos, como eletricidade, luz, temperatura, etc.
- Foi realizado um *web survey* de abrangência mundial com pesquisadores da área de engenharia de tecidos – autores de artigos científicos relacionados à área de engenharia de tecidos e indexados na base *Web of Science Core Collection* (WoS) . O questionário de natureza prospectiva (2018-2038) foi elaborado com base em uma revisão de literatura sobre 3D/4D *bioprinting*, engenharia de tecidos e alternativas para substituição de animais em pesquisa. Utilizando-se a plataforma de pesquisa on-line *SurveyMonkey*, o questionário foi enviado para 17.429 pesquisadores e obteve uma taxa de resposta de 4,6%. Tal ferramenta buscou identificar as expectativas dos pesquisadores quanto ao futuro das tecnologias 3D/4D *bioprinting* nos campos médico e biomédico.
- De forma geral, os resultados indicam que, em até 20 anos, as tecnologias 3D/4D *bioprinting* certamente propiciarão:
 - produção sob demanda de órgãos e tecidos paciente específicos totalmente funcionais para serem implantados em humanos;
 - reparação de lesões *in situ* utilizando as próprias células dos pacientes;
 - modelos de testes de drogas que atendam requerimentos de testes de toxicidade;
 - modelos de doenças humanas que atendam requerimentos de pesquisa;
 - substituição de animais em pesquisa e em testes de toxicidade;
 - superação de desafios científicos e tecnológicos, como: desenvolvimento de *bioinks*, *bioprinters* e *scaffolds* de alta performance; vascularização de tecidos e órgãos bioimpressos; e escalabilidade de modelos bioimpressos de baixo custo para pesquisa pré-clínica e laboratorial.
- Em síntese, os resultados deste estudo sugerem que, nas próximas duas décadas, inovações derivadas da engenharia de tecidos, viabilizadas pelas tecnologias 3D/4D *bioprinting*, levarão a mudanças radicais nos campos médico e biomédico e na sociedade como um todo.

SUMÁRIO

1- Introdução	9
2- Material e Método	10
3- Resultados	12
4- Conclusão	19
5- Referências Bibliográficas	20

1- Introdução

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar (Ho et al. 2017) que integra áreas de conhecimento, como química, biologia e engenharia (Mondschein et al. 2017). Seu principal objetivo é a fabricação de órgãos e tecidos funcionais para serem utilizados em medicina regenerativa e em testes de medicamentos (Richards et al. 2013). Trata-se de um campo emergente que visa substituir/restaurar tecidos e órgãos humanos (Gao e Cui 2016; Huang et al. 2017; Zhu et al. 2016; Colasante et al. 2016; Mondschein et al. 2017).

A engenharia de tecidos apresenta vantagens em relação a outras técnicas de manipulação de células, como, por exemplo, a capacidade de criar complexas estruturas celulares em 3D contendo células humanas (Vries et al. 2015). No entanto, persistem importantes desafios a serem superados, tal e qual a construção de tecidos e órgãos vascularizados (Gao e Cui 2016; Vries et al. 2015; Duan 2017), essencial para mantê-los vivos e intactos por um longo período de tempo (Vries et al. 2015). Peles construídas por engenharia de tecidos, eg., ainda carecem de vascularização funcional, o que limita a sua aplicação, seja em pesquisa básica ou clínica (Groeber et al. 2016).

Outro tipo de desafio está relacionado ao uso de animais em pesquisa e testes de toxicidade. As altas taxas de candidatos a medicamentos que falham em ensaios clínicos sugerem que diferenças interespecíficas fazem dos animais preditores não confiáveis de toxicidade em humanos (Löwa et al. 2018; Balls 2014; Rosania 2013). Nesse sentido, o aumento das taxas de sucesso no desenvolvimento de novos medicamentos poderia ser alcançado por meio do uso de métodos baseados em humanos (*human-based methods*) em pesquisa básica e pré-clínica (Burden et al. 2017b; Löwa et al. 2018). Nas próximas décadas, espera-se que avanços oriundos da engenharia de tecidos possam levar à substituição total de animais em pesquisa (Bandyopadhyay et al. 2018) ou ao menos à diminuição do seu uso (Zhu et al. 2016).

Em grande parte, os esforços voltados ao desenvolvimento de alternativas ao uso de animais em pesquisa estão relacionados ao conceito dos 3Rs (redução,

refinamento e substituição) (Löwa et al. 2018; Doke e Dhawale 2015; Brannen et al. 2016). Aqui, substituição de animais refere-se a “*methods that avoid or replace the use of animals in areas where they would have otherwise been used*” (Graham e Prescott 2015, pág. 20). Nessa direção, a indústria farmacêutica vem desenvolvendo e validando ensaios alternativos (*in vitro*, *tissue*, *embryo culture*, *non-mammalian* etc.) para testes de drogas e exames toxicológicos (Goh et al. 2015; Brannen et al. 2016; Löwa et al. 2018).

Para lidar com tais questões, o uso de tecnologias de impressão 3D é frequentemente apontado como um caminho promissor (Richards et al. 2013; Gao e Cui 2016; Duan 2017; Zhu et al. 2016). A impressão 3D (*3D printing*) é uma técnica de fabricação aditiva que produz objetos tridimensionais a partir de modelos digitais pela adição de materiais camada por camada (Li et al. 2014; Ahn et al. 2016; Park et al. 2016). No campo da engenharia de tecidos, essas tecnologias também são conhecidas como *3D bioprinting*, *4D printing* e *4D bioprinting*. A bioimpressão (*bioprinting*) é um processo voltado à impressão de sistemas biológicos e funcionais (Huang et al. 2017) por meio da utilização de células, biomateriais, *bioscaffolds*, fatores de crescimento e fatores biológicos (Ahn et al. 2016; Gao e Cui 2016; Huang et al. 2017). Para tanto, bioimpressoras 3D (*3D bioprinters*) usam fluidos contendo biomateriais e/ou células vivas. Esses fluidos, conhecidos como *bioinks*, variam de hidrogéis (que utilizam, e.g., alginato, colágeno, fibrina ou metacrilato de gelatina) a agregados celulares, microtransportadores e matrizes decelularizadas (Whitford e Hoying 2016; Gungor-Ozkerim et al. 2018; Hospodiuk et al. 2017). A quarta dimensão (4D) é o tempo (Colasante et al. 2016) e envolve o uso de materiais inteligentes que respondem a estímulos externos (eletricidade, luz, temperatura etc.) (Jang et al. 2018). Existem pelo menos nove tipos de *3D printers* (3dinsider.com/3d-printer-types/) e mais de quarenta técnicas de impressão aplicáveis à pesquisa (Huang et al. 2017). Quando se trata especificamente de *bioprinting*, as técnicas mais comuns são *inkjet bioprinting*, *extrusion bioprinting*, *laser assisted bioprinting* (Sears et al. 2016; Huang et al. 2017; Gao e Cui 2016; Zhu et al. 2016), *stereolithography* (Sears et al. 2016; Huang et al. 2017), *powder-fusion printing* e *solid freeform fabrication* (Sears et al. 2016).

Na literatura médica e biomédica, os termos 4D *printing* e 4D *bioprinting* são menos frequentes do que 3D *printing* e 3D *bioprinting* – talvez por serem relativamente recentes na pesquisa médica (Colasante et al. 2016). E, em geral, eles parecem ser usados de forma intercambiável. Assim, por simplicidade, neste estudo nos referiremos a esse conjunto de tecnologias como 3D/4D *bioprinting*.

Uma variedade de tecidos (pele, osso, cartilagem, tecido nervoso, etc.) tem sido gerada por meio da 3D/4D *bioprinting* (Huang et al. 2017; Park et al. 2016). Uma das maiores expectativas é que a tecnologia possa fornecer órgãos funcionais passíveis de serem implantados em humanos, o que poderia eventualmente resolver o problema da escassez de órgãos para doação (Huang et al. 2017; Gao e Cui 2016; Zhu et al. 2016). Outra grande expectativa é que 3D/4D *bioprinting* forneça tecidos e órgãos humanos para testes de toxicidade de drogas, evitando, como consequência, o uso de animais (Rosania 2013; Zhu et al. 2016).

De forma geral, 3D/4D *bioprinting* pode ser considerada uma tecnologia disruptiva, uma vez que promete superar limitações das abordagens convencionais/tradicionais da engenharia de tecidos (Gao e Cui 2016; Huang et al. 2017; Park et al. 2016; Singh et al. 2016; Stratton et al. 2018, 2018). No entanto, seu uso na engenharia de tecidos ainda está no início (Duan 2017; Gao e Cui 2016; Huang et al. 2017; Zhu et al. 2016). E, assim, longe da indústria (Gao e Cui 2016). Existe, portanto, um alto nível de incerteza quanto ao futuro dessa tecnologia nos campos médico e biomédico. Além disso, a ampla adoção de alternativas confiáveis que eventualmente levem à substituição de animais em pesquisa pode depender do sucesso das tecnologias 3D/4D *bioprinting* em prover soluções desde a pesquisa básica até a prática médica. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao problema da escassez de órgãos para doação.

O objetivo deste estudo é gerar informação qualificada sobre o futuro das tecnologias 3D/4D *bioprinting* nos campos médico e biomédico. Para tanto, realizamos um *web survey* de abrangência mundial com pesquisadores

da área de engenharia de tecidos. A ênfase foi dada à possibilidade dessas tecnologias fornecerem tecidos e órgãos humanos para implante, pesquisa e testes de toxicidade. Até onde sabemos, poucos estudos tentaram antecipar resultados futuros da 3D/4D *bioprinting* nos campos médico e biomédico. A maioria deles baseia-se em revisão de literatura e aborda apenas alguma aplicação específica (tecidos cardiovasculares, tecidos cutâneos, etc.) (Albritton e Miller 2017; Colasante et al. 2016; Mehrban et al. 2016; Mosadegh et al. 2015; Park et al. 2016; Stratton et al. 2018; Tarassoli et al. 2018; Zhang e Zhang 2015). Assim, nosso estudo vai além ao apresentar as expectativas de pesquisadores relacionados à engenharia de tecidos.

2- Material e Método

Realizou-se um *web survey* de abrangência mundial com pesquisadores da área de engenharia de tecidos. A lista de respondentes foi gerada a partir de endereços eletrônicos recuperados de publicações científicas recentes indexadas na *Web of Science Core Collection* (WoS), da *Thomson Reuters*. As publicações relacionadas à engenharia de tecidos foram identificadas de acordo com a seguinte estratégia de busca aplicada ao modo de pesquisa avançada na WoS:

(ts=("Tissue Engineer*"))

I n d e x e s = S C I - E X P A N D E D

Timespan=2013-2018

A busca foi realizada em julho de 2018 e obteve 24.776 registros de publicações científicas (todos os tipos de documentos). Utilizou-se a tag “topic” (ts), que retorna resultados a partir da busca nos campos título, resumo e palavras-chave dos artigos indexados na WoS. Uma vez que o *web survey* era direcionado a pesquisadores da área de ciências naturais, utilizou-se somente o indexador *Science Citation Index Expanded* (SCI-EXPANDED), evitando-se, assim, publicações indexadas em ciências sociais e em artes e humanidades. O intervalo foi restringido ao período 2013-2018 (até julho), de modo a identificar respondentes que publicaram resultados recentes de pesquisa.

Os 24.776 registros foram importados para o software de *data/text mining VantagePoint* 10.0. Aplicando-se o script/roteiro *Super Profile*, 17.990 e-mails foram recuperados. Em seguida, utilizando-se um código *Phyton* de elaboração própria, 83% dos endereços eletrônicos foram vinculados aos nomes de seus proprietários. A lista de respondentes foi, então, enviada para a plataforma de pesquisa on-line *SurveyMonkey* (surveymonkey.com/), onde elaboramos o questionário e conduzimos o *web survey*. Após o upload, o número de e-mails foi reduzido para 17.429 devido a endereços eletrônicos e contatos incorretos e/ou inexistentes.

O questionário foi baseado em uma revisão da literatura sobre 3D/4D *bioprinting*, engenharia de tecidos e alternativas para substituição de animais em pesquisa. Tal revisão foi realizada a partir da leitura de publicações selecionadas, identificadas na WoS de acordo com as seguintes estratégias de busca:

(ti=(“4D bioprint*” OR “4D bio-print*” OR “four-dimensional bioprint*” OR “four-dimensional bio-print*” OR “4-dimensional bioprint*” OR “4-dimensional bio-print*” OR “four-D bioprint*” OR “four-D bio-print*” OR “4D print*” OR “four-dimensional print*” OR “4-dimensional print*” OR “four-D print*” OR “3D bioprint*” OR “3D bio-print*” OR “three-dimensional bioprint*” OR “three-dimensional bio-print*” OR “3-dimensional bioprint*” OR “3-dimensional bio-print*” OR “three-D bioprint*” OR “three-D bio-print*” OR “3D print*” OR “three-dimensional print*” OR “3-dimensional print*” OR “three-D print*”) AND LANGUAGE: (English) Indexes=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI Timespan=2013-2018 (ti=(“animal* testing alternative*” OR “alternative* to animal* testing” OR “animal* use alternative*” OR “alternative* to animal*

use” OR “animal* experiment* alternative*” OR “alternative* to animal* experiment*” OR “animal* research alternative*” OR “alternative* to animal* research” OR “animal* model* alternative*” OR “alternative* to animal* model*” OR “lab* animal* alternative*” OR “alternative* to lab* animal*” OR “reduction, refinement and replacement*” OR “3Rs” OR “three-Rs”)) AND LANGUAGE: (English) Indexes=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI Timespan=2013-2018

As estratégias de busca combinaram termos do *Medical Subject Headings* (ncbi.nlm.nih.gov/mesh) e palavras de texto livre, abrangendo os descritores mais comuns relacionados a esses assuntos. A busca foi realizada em julho de 2018 e obteve 276 registros da primeira estratégia e 191 da segunda. Ambos os métodos foram aplicados ao modo de pesquisa avançada da WoS usando a tag “title” (ti), idioma (inglês), *timespan* (2013-2018) e todos os índices de citação (SCI-EXPANDED, SSCI, A e HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI). Os registros foram importados para o *VantagePoint* 10.0, no qual uma primeira seleção foi feita por meio da leitura de títulos e resumos de artigos. A partir disso, foram pré-selecionadas 114 publicações, das quais foi possível fazer o download de 92 documentos (formato PDF).

Tais registros foram, então, importados para o software de gerenciamento de referências *Citavi* 6.1, em que foi realizada a seleção final com base na leitura dos documentos completos. Ao final desse processo, selecionamos as seguintes 35 publicações que serviram de base para a elaboração do questionário aplicado: Ahn et al. 2016; Albritton e Miller 2017; Almela et al. 2018; Balls 2014; Brunello et al. 2016; Burden et al. 2017a; Cheluvappa et al. 2017; Colasante et al. 2016; Doke e Dhawale 2015; Duan 2017; Faramarzi et al. 2018; Fleetwood et al. 2015; Gao e Cui 2016; Garreta et al. 2017; Goh et al. 2015; Graham e Prescott 2015; Groeber et al. 2016; Huang et al. 2017; Löwa et al. 2018; Mehrban et al. 2016; Mohanty et al. 2016; Mori et al. 2018; Mosadegh et al. 2015; Ng et al. 2016; O’Connell et al. 2017; Obregon et al. 2015; Park et al. 2016; Richards et al. 2013; Stratton et al. 2018; Stokes 2015;

Tarassoli et al. 2018; Vanderburgh et al. 2017; Zhang e Zhang 2015; Zhao et al. 2016; Zhu et al. 2016.

O questionário considera um horizonte futuro de vinte anos (2018-2038) e está estruturado em três partes. A primeira, solicita que os respondentes informem o seu nível de conhecimento sobre 3D/4D *bioprinting* no campo da engenharia de tecidos. Essa questão de qualificação/desqualificação funciona como um filtro. Assim, aqueles que indicaram não ter conhecimento foram desqualificados da pesquisa e não deram prosseguimento ao questionário. A segunda parte apresenta cinco afirmações sobre o futuro. As afirmações concentraram-se na possibilidade de 3D/4D *bioprinting* levar a: (1) produção sob demanda de órgãos e tecidos paciente específicos totalmente funcionais para serem implantados no doador das células; (2) reparação de lesões *in situ* utilizando as próprias células dos pacientes; (3) modelos de testes de drogas que atendam a requerimentos de testes de toxicidade; (4) modelos de doenças humanas que atendam a requerimentos de pesquisa; e (5) substituição de animais em pesquisa e em testes de toxicidade. Para cada afirmação, os respondentes foram solicitados a indicar a probabilidade e o período de ocorrência (antes ou depois de 2038). A parte final do questionário pedia aos respondentes que indicassem a probabilidade de desafios científicos e tecnológicos selecionados a serem superados em até 20 anos. No geral, os desafios referem-se a avanços esperados em *bioprinters*, *bioinks*, *scaffolds*, vascularização de tecidos e órgãos, e bioimpressão de modelos humanos para pesquisa.

O *web survey* foi realizado entre outubro e novembro de 2018. As mensagens eletrônicas para convite foram enviadas durante três semanas. O questionário ficou disponível por oito dias consecutivos após o envio do e-mail convite. Durante tal período, até três mensagens lembretes foram enviadas para não respondentes. No *SurveyMonkey*, os respondentes foram distribuídos em três coletores de acordo com o país de origem do seu endereço eletrônico (Country code top-level domain (ccTLD)). Os e-mails com final “.com” foram distribuídos aleatoriamente entre os coletores. O primeiro abrangeu as Américas. O

segundo, a Europa e a África. Já o terceiro, Rússia, Ásia e Oceania. Para enviar convites e lembretes, o primeiro coletor tomou como referência o horário de Washington (EUA), o segundo, Berlim (Alemanha), e o terceiro, Beijing (China).

Todos os respondentes receberam informações sobre o estudo no momento da coleta de dados por meio dos e-mails convite e lembretes. De forma geral, o conteúdo de ambas as mensagens eletrônicas abarcaram os seguintes itens: nome do autor; título da publicação; propósito do estudo; organização e financiador da pesquisa; link para o questionário e período em que o mesmo estaria disponível; e declaração de que os dados coletados seriam anonimizados nos resultados, e os respondentes não seriam identificados individualmente em nenhum relatório. Os respondentes que aceitaram participar da pesquisa foram direcionados ao questionário por meio do link presente nos e-mails convite e lembrete. Os procedimentos adotados neste estudo seguiram a literatura especializada em *web surveys* (Fan e Yan 2010; Keusch 2012; Liu et al. 2016; van Mol 2017; Sauermann e Roach 2013; Boulianne et al. 2011; Petrovcic et al. 2016; Kaplowitz et al. 2012).

3- Resultados

A taxa de resposta à pesquisa foi de 4,6%. De 17.429 convites enviados a pesquisadores da engenharia de tecidos, obtivemos 740 retornos válidos (foram excluídas 61 respostas de pesquisadores sem conhecimento no tema). Desses, 673 (90,9%) consistiram em questionários totalmente respondidos – eram necessários 376 questionários totalmente preenchidos para se obter uma amostra representativa com intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%. Das respostas válidas, 38,4% e 61,6% referem-se, respectivamente, a pesquisadores que declararam ter “bom conhecimento” e “algum conhecimento” sobre 3D/4D *bioprinting* no campo da engenharia de tecidos. Neste relatório, as respostas de ambos os grupos de conhecimento são apresentadas de forma agregada – os casos de diferença estatística entre os dois grupos serão informados quando pertinente.

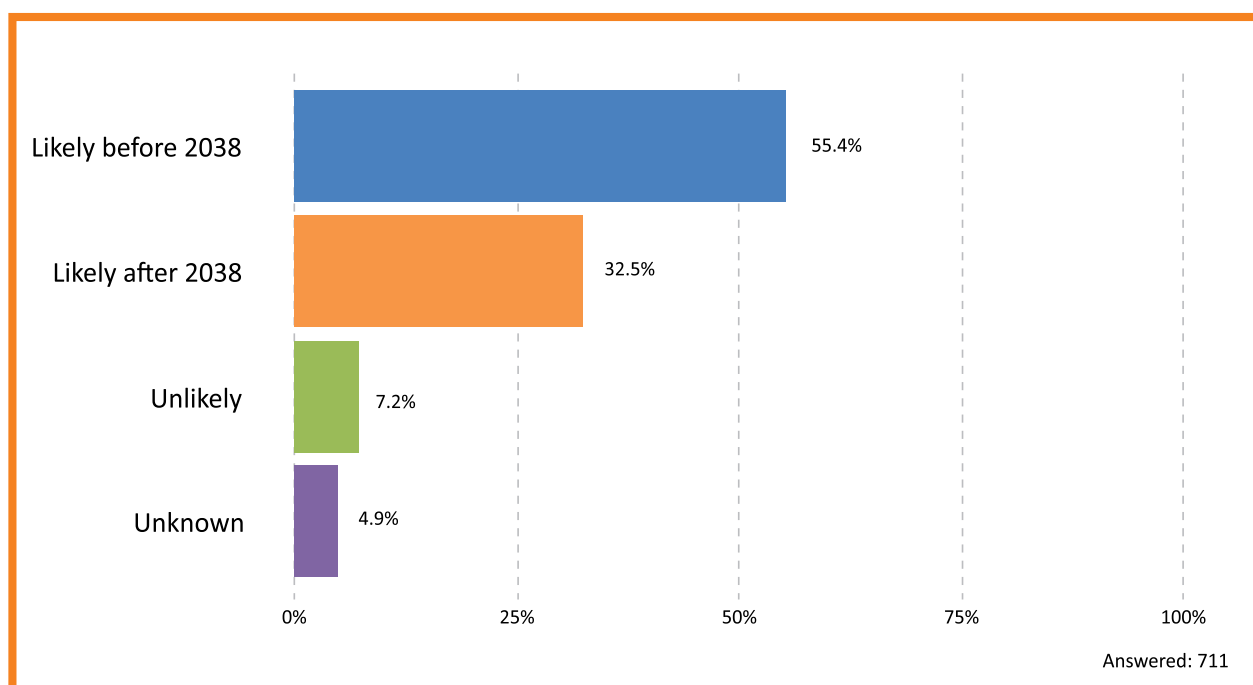
A partir do *Internet Protocol* (IP) do endereço eletrônico dos respondentes foi possível verificar que pesquisadores de 66 países cooperaram com esta pesquisa. Vinte e seis países tiveram pelo menos 1% de participação. Juntos, foram responsáveis por 85,9% dos questionários respondidos. Os Estados Unidos tiveram o maior número de participantes (15,8%), seguido pelo Brasil (8,5%), Itália (7,0%), Índia (4,9%), Reino Unido (4,7%) e Alemanha (4,3%).

O problema da escassez de órgãos para doação impulsionou pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de tecidos e órgãos humanos artificiais (Colasante et al. 2016; Garreta et al. 2017; Huang et al. 2017). Nesse contexto, dentre as possíveis aplicações de 3D/4D *bioprinting*, a impressão de órgãos é a mais esperada (Garreta et al. 2017). Embora 3D/4D *bioprinting* seja uma tecnologia emergente, a produção de tecidos humanos menos sofisticados já se mostrou possível (Garreta et al. 2017; Ng et al. 2016; Stratton et al. 2018) – vide o caso da impressão de uma tala de traqueia via 3D/4D *bioprinting*, implantada em uma criança, em 2012 (Zopf

et al. 2013). Todavia, a produção de órgãos complexos parece ser um grande desafio e, assim, alguns autores projetam isso para um futuro distante (Obregon et al. 2015; Stratton et al. 2018; Colasante et al. 2016). Ainda persistem dúvidas sobre se os órgãos poderão ser paciente específicos, o que minimizaria a rejeição imunológica (Colasante et al. 2016; Ng et al. 2016; Obregon et al. 2015), bem como se poderão ser produzidos sob demanda (Obregon et al. 2015).

Embora haja otimismo, a literatura deixa em aberto se tais tecnologias permitirão a produção de tecidos e órgãos totalmente funcionais para serem implantados em pacientes (Zhang e Zhang 2015; Huang et al. 2017). De acordo com 87,9% dos respondentes da pesquisa (Figura 1), 3D/4D *bioprinting* provavelmente será capaz de produzir tecidos e órgãos paciente específicos totalmente funcionais, produzidos sob demanda para serem implantados no doador das células, evitando, assim, rejeição imunológica. Dos 711 pesquisadores que responderam essa questão, 55,4% esperam que isso ocorra antes de 2038.

Figura 1: Afirmação 1: 3D/4D *bioprinting* levará à produção sob demanda de tecidos e órgãos paciente específicos totalmente funcionais para serem implantados no doador das células, evitando rejeição imunológica.

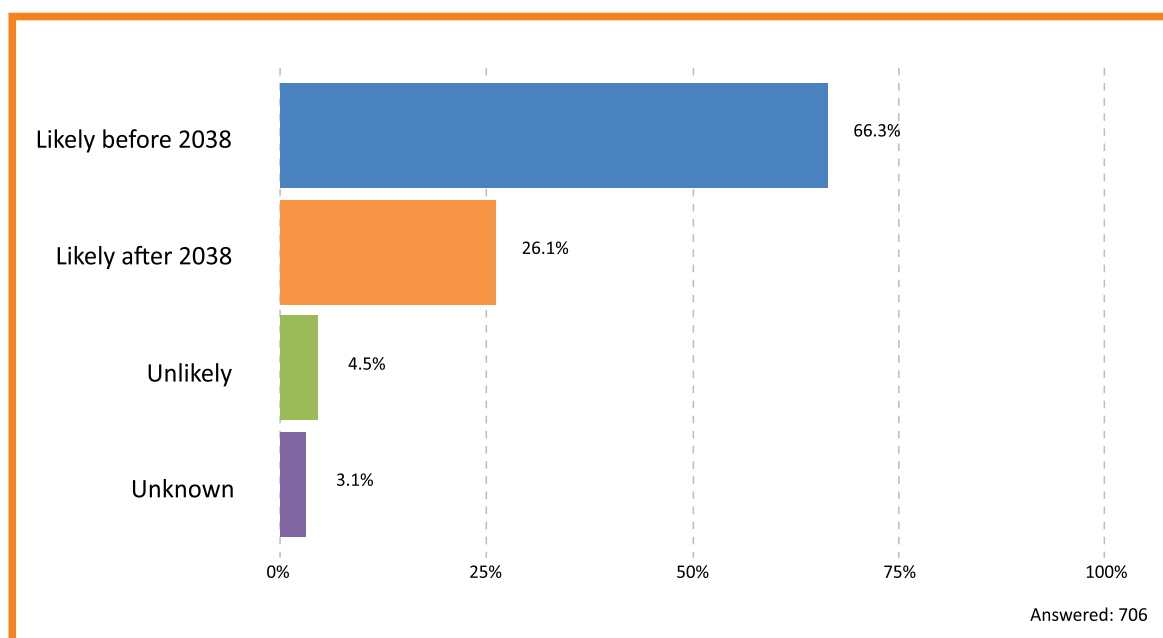


*As respostas “unknown” dos respondentes que disseram ter “algum conhecimento” são estatisticamente maiores do que as respostas daqueles que afirmaram ter “bom conhecimento”.

Outra possível aplicação clínica de 3D/4D *bioprinting* é o tratamento de pacientes diretamente no local lesionado (Huang et al. 2017; Ng et al. 2016; Mehrban et al. 2016). O conceito de *bioprinting in situ* (ou *in vivo*) refere-se a um sistema capaz de escanear a lesão do paciente e imprimir um reparo no específico local lesionado (Ng et al. 2016; Huang et al. 2017; Mehrban et al. 2016) usando as células do próprio paciente (Huang et al. 2017). Tal procedimento poderia evitar a necessidade de intervenções cirúrgicas subsequentes (Huang et al. 2017) e também reduzir o tempo de recuperação do paciente (Park et al. 2016). Como é desejável que cirurgias levem o menor tempo possível, a resolução e

a velocidade de impressão dos bioprinters precisam ser aumentadas (Park et al. 2016). No geral, a bioimpressão *in situ* parece ser plausível, mas incerta. Isso porque exigiria, por exemplo, avanços nas *bioinks* (Huang et al. 2017), na resolução e na velocidade de impressão dos *bioprinters* (Park et al. 2016), e na integração entre *bioprinters* e robótica (Huang et al. 2017). Apesar das atuais limitações tecnológicas, 92,4% dos respondentes relataram que 3D/4D *bioprinting* provavelmente permitirá o uso das próprias células dos pacientes para reparar lesões *in situ* (Figura 2). As expectativas são particularmente altas, visto que 66,3% dos pesquisadores relataram que isso provavelmente acontecerá em menos de vinte anos.

Figura 2: Afirmação 2: 3D/4D *bioprinting* permitirá o uso das próprias células dos pacientes para reparar lesões *in situ*



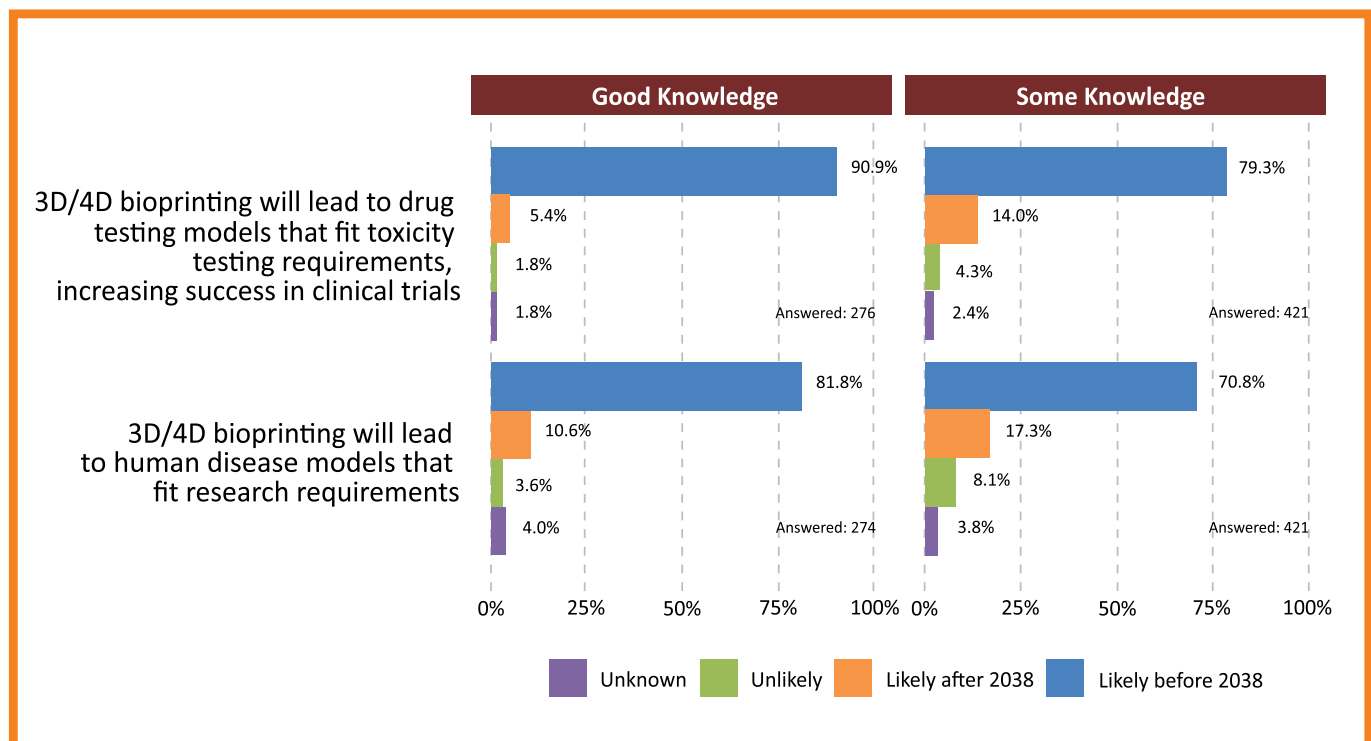
Parcialmente devido a diferenças interespecíficas, as altas taxas de falha em estudos clínicos podem estar relacionadas ao uso de animais como modelos de doenças e preditores de toxicidade em humanos (Löwa et al. 2018; Balls 2014; Rosania 2013). Nesse sentido, o sucesso em ensaios clínicos e, portanto, no desenvolvimento de medicamentos exigiria o uso de métodos mais humanos em pesquisas básicas e pré-clínicas

(Burden et al. 2017b; Löwa et al. 2018). Como dito, 3D/4D *bioprinting* parece ser um caminho promissor para alcançar esse objetivo (Richards et al. 2013; Gao e Cui 2016; Duan 2017; Zhu et al. 2016). Espera-se que essas tecnologias permitam gerar modelos de *drug delivery* e modelos de doenças humanas para uso em pesquisa e em testes de toxicidade, reduzindo riscos em ensaios clínicos (Richards et al. 2013).

Nessa perspectiva, os respondentes foram questionados sobre a probabilidade de 3D/4D *bioprinting* produzir: (1) modelos de testes de drogas que atendam requerimentos de testes de toxicidade, levando ao aumento das taxas de sucesso dos ensaios clínicos; e (2) modelos de doenças humanas que atendam requerimentos de pesquisa. A Figura 3 mostra tais resultados. Houve diferença estatística entre as respostas dos grupos de conhecimento. Embora a maioria dos

respondentes acredite que as duas afirmações sobre o futuro são prováveis, aqueles com “bom conhecimento” parecem mais otimistas. Por exemplo, 90,9% deles esperam que a tecnologia leve a modelos de testes de drogas adequados para testes de toxicidade em até vinte anos. Considerando ambas as afirmações, a expectativa sobre a probabilidade de 3D/4D *bioprinting* gerar modelos de doenças humanas para uso em pesquisa é ligeiramente menor.

Figura 3: Afirmações 3 e 4: 3D/4D *bioprinting* levará a modelos de testes de drogas e modelos de doenças humanas que atenderão, respectivamente, requerimentos de testes de toxicidade e de pesquisa



Na pesquisa médica e biomédica, animais – como roedores, coelhos e cães – são usados como ferramentas para o desenvolvimento de novos medicamentos, vacinas, dispositivos biológicos, dispositivos médicos, procedimentos médicos etc. (Doke e Dhawale 2015; Graham e Prescott 2015). Experimentos de pesquisa podem usar todo o animal ou só parte de seus tecidos e órgãos. Ao final do experimento, eles são frequentemente sacrificados ou morrem em consequência dos procedimentos aplicados (Doke e Dhawale 2015). O uso de animais para fins científicos se dá por uma

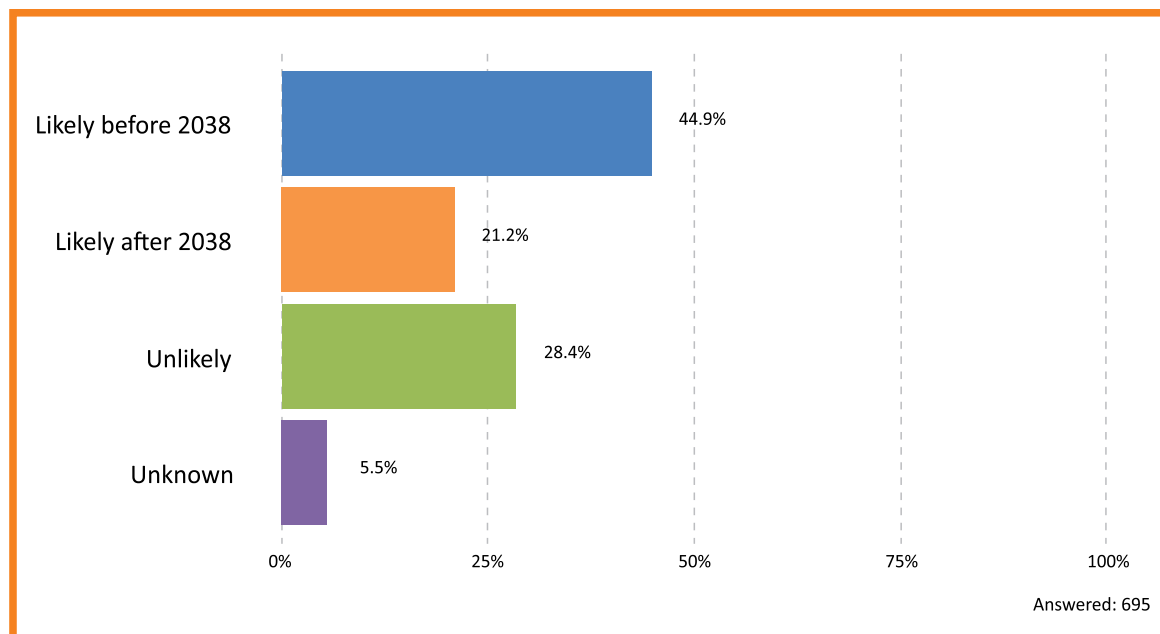
variedade de razões, tais como serem considerados bons modelos para humanos e para doenças humanas (Cheluvappa et al. 2017); por ser uma abordagem de pesquisa já estabelecida para o estudo dos mecanismos de progressão de doenças (Vanderburgh et al. 2017); requisitos legais e regulatórios que exigem testes de segurança pré-clínica *in vivo* antes que um medicamento em desenvolvimento possa ser testado em humanos (Goh et al. 2015; Stokes 2015); ausência de modelos que mimetizem condições fisiológicas dos órgãos humanos (Groeber et al. 2016); falta

de implementação de métodos alternativos (Stokes 2015); e ainda aspectos culturais relacionados à pesquisa (Burden et al. 2017a).

O uso de animais para fins científicos é usualmente regulado por diretrizes éticas e legislações nacionais e/ou internacionais destinadas a proteger os direitos e bem-estar dos animais (Graham e Prescott 2015; Chevuvappa et al. 2017; Fleetwood et al. 2015). Contudo, atualmente, vivenciamos um aumento das pressões éticas, políticas e sociais para que sejam desenvolvidas alternativas aos animais em pesquisa (Löwa et al. 2018). Parte da comunidade científica alega que, pra humanos, animais não são bons modelos de doenças e nem preditores confiáveis de toxicidade, como já dito anteriormente (Löwa et al. 2018; Balls 2014; Rosania 2013; Vanderburgh et al. 2017).

Assim, uma vez que se espera que avanços futuros na engenharia de tecidos reduzam ou mesmo substituam o uso de animais em pesquisas (Bandyopadhyay et al. 2018; Zhu et al. 2016), os respondentes foram questionados sobre a probabilidade de 3D/4D *bioprinting* levar à substituição de animais em pesquisa e em testes de toxicidade. A Figura 4 apresenta os resultados. Para 66,1% dos respondentes, provavelmente não mais veremos animais sendo usados em pesquisas e em testes de toxicidade no futuro. E isso deverá ocorrer em até vinte anos para 44,9% deles. Um número significativo de pesquisadores (28,4%) reportou, porém, que a substituição de animais em pesquisa é improvável. Tal resultado é, de certa forma, esperado, uma vez que, e.g., atuais requisitos regulatórios e aspectos culturais relacionados à pesquisa podem dificultar a adoção de modelos gerados via 3D/4D *bioprinting* (Niemi e Davies 2016).

Figura 4: Afirmação 5: 3D/4D *bioprinting* levará à substituição de animais em pesquisa e em testes de toxicidade



Atualmente, o uso de tecnologias 3D/4D *bioprinting* na pesquisa médica e biomédica envolve diversos desafios científicos e tecnológicos. A Figura 5 denota as opiniões dos respondentes sobre a probabilidade de cinco desafios selecionados serem superados em até

vinte anos. O primeiro diz respeito ao desenvolvimento de *bioprinters* 3D/4D de alta resolução e alta velocidade, compatíveis com uma ampla gama de biomateriais (Duan 2017; Garreta et al. 2017; Zhu et al. 2016; Huang et al. 2017; Albritton e Miller 2017). Atualmente, os

processos de *bioprinting* são demorados e de trabalho intensivo (Duan 2017). Outra questão apresentada se refere à falta de padronização entre *bioprinters* – desenvolvidas principalmente para uso em laboratório (Zhu et al. 2016) – o que limita a reprodutibilidade interlaboratórios e seu uso por não especialistas (Albritton e Miller 2017). Apesar das limitações das atuais *bioprinters*, 92,7% dos respondentes consideraram provável que esse desafio será superado antes de 2038.

O segundo desafio refere-se ao desenvolvimento de *bioinks* de alto desempenho para processos de proliferação celular, diferenciação e produção de tecidos e órgãos (Duan 2017; Mosadegh et al. 2015; Albritton e Miller 2017; Huang et al. 2017). Não existem, ainda, *bioinks* capazes de permitir a bioimpressão de tecidos e órgãos biologicamente funcionais (Duan 2017). A falta de *bioinks* de alto desempenho limita o progresso no campo da engenharia de tecidos e, conseqüentemente, a translação dos resultados da pesquisa para a prática clínica (Mori et al. 2018). No entanto, esse desafio não parece ser uma preocupação para o futuro, pois 87,2% dos respondentes esperam que *bioinks* de alto desempenho sejam desenvolvidos nos próximos vinte anos.

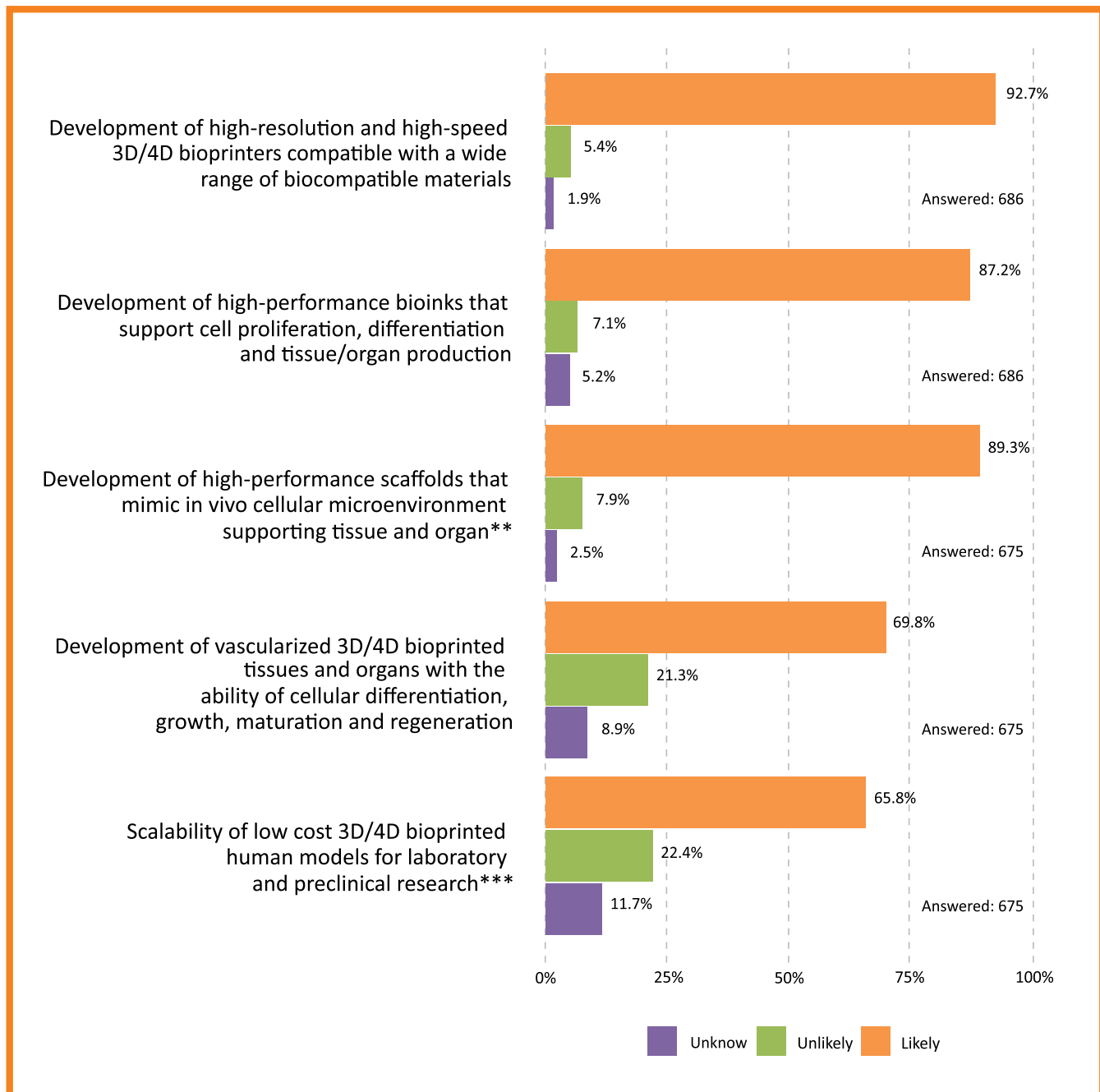
O terceiro desafio selecionado refere-se ao desenvolvimento de *scaffolds* de alto desempenho que mimetizem microambientes celulares *in vivo* e suportem a formação de tecidos e órgãos (Tarassoli et al. 2018; Mohanty et al. 2016; Sears et al. 2016). Os *scaffolds* são estruturas biocompatíveis que fornecem um ambiente onde as células podem se ligar e crescer (Brunello et al. 2016). Os biomateriais e métodos de bioimpressão mais adequados para a sua produção ainda não foram definidos (O’Connell et al. 2017; Tarassoli et al. 2018). Os *scaffolds* produzidos atualmente carecem de porosidade e perfusão, comprometendo o crescimento celular (Brunello et al. 2016; Mohanty et al. 2015). Essa limitação diminui a sobrevivência dos tecidos e órgãos bioimpressos (Sears et al. 2016). Também aqui quase a totalidade (89,3%) dos pesquisadores indicaram que a superação desse desafio deverá ocorrer em até vinte anos.

O desenvolvimento de tecidos e órgãos vascularizados é um dos maiores desafios a serem superados pela

engenharia de tecidos (Richards et al. 2013; Tarassoli et al. 2018; Zhao et al. 2016). Esse foi o quarto desafio selecionado. Redes vasculares conduzem nutrientes e oxigênio necessários ao crescimento e regeneração celular (Mohanty et al. 2016). Por isso, a manutenção das células vivas depende da integração e maturação das redes vasculares (Zhu et al. 2016). Atualmente, 3D/4D *bioprinting* é incapaz de construir redes vasculares habilitadas a realizar atividades celulares naturais (Zhu et al. 2016; Vries et al. 2015). Uma vez que tecidos maiores requerem redes vasculares mais complexas, essa deficiência vascular limita o tamanho dos modelos bioimpressos (Tarassoli et al. 2018; Mohanty et al. 2016; Zhu et al. 2016). Cerca de 30% dos respondentes relataram que, nos próximos vinte anos, a bioimpressão de tecidos e órgãos vascularizados capazes de permitir processos de diferenciação, crescimento, maturação e regeneração celular é improvável ou desconhecida. De certa forma, esse resultado levanta preocupações sobre o futuro, uma vez que a vascularização é considerada um dos principais obstáculos para a produção de tecidos e órgãos totalmente funcionais via 3D/4D *bioprinting*. Como já dito, espera-se que esses produtos bioimpressos possam eventualmente resolver o problema da escassez de órgãos para doação (Huang et al. 2017; Gao e Cui 2016; Zhu et al. 2016). De toda forma, as expectativas para o futuro são positivas, considerando-se que mais de dois terços dos respondentes acreditam que a engenharia de tecidos será capaz de lidar com esse desafio.

O último desafio selecionado refere-se a um dos aprimoramentos necessários para que 3D/4D *bioprinting* seja amplamente adotada em laboratórios de pesquisa. Para que isso aconteça, essa técnica deve apresentar baixo custo e escalabilidade. Atualmente, os métodos de bioimpressão são trabalhosos e demorados, dificultando a sua adoção nas rotinas laboratoriais (Zhu et al. 2016; Mohanty et al. 2016; Tarassoli et al. 2018; Almela et al. 2018; Duan 2017; Lücking et al. 2015; Garreta et al. 2017). De acordo com 65,8% dos respondentes, modelos humanos bioimpressos para pesquisa laboratorial e pré-clínica provavelmente apresentarão escalabilidade e baixo custo em até vinte anos. Entre os desafios selecionados, esse apresentou o maior percentual de respostas “unlikely” (22,4%) e “unknown” (11,7%).

Figura 5: Probabilidade de desafios científicos e tecnológicos serem superados em até 20 anos



**As respostas “unlikely” dos respondentes que disseram ter “algum conhecimento” são estatisticamente menores do que as respostas daqueles que afirmaram ter “bom conhecimento”.

***As respostas “unknown” dos respondentes que disseram ter “algum conhecimento” são estatisticamente maiores do que as respostas dos respondentes que afirmaram ter “bom conhecimento”.

4- Conclusão

Este estudo buscou antecipar o futuro das tecnologias 3D/4D *bioprinting* nos campos médico e biomédico. As possíveis aplicações dessas tecnologias foram avaliadas a partir das expectativas de pesquisadores da engenharia de tecidos de todo o mundo. De forma geral, os resultados sugerem otimismo quanto à probabilidade de 3D/4D *bioprinting* obter êxito em superar alguns dos principais desafios colocados à pesquisa em engenharia de tecidos. A maioria dos respondentes apontou que, em até vinte anos, as técnicas de 3D/4D *bioprinting* deverão gerar tecidos e órgãos tanto para serem implantados em humanos como utilizados em pesquisa e testes de toxicidade.

Se o futuro confirmar tais expectativas, nas próximas décadas provavelmente teremos uma solução para o problema da escassez de órgãos para doação, bem como alternativas factíveis ao uso de animais em pesquisa. No entanto, como a substituição de animais em pesquisa não parece ser um dos principais alvos da engenharia

de tecidos, avanços adicionais na perspectiva dos 3Rs dependerão em parte do sucesso das tecnologias 3D/4D *bioprinting* em fornecer tecidos e órgãos para pesquisa e testes de toxicidade.

Os *feedbacks* dos respondentes sugerem que promover mudanças regulatórias que acompanhem avanços da engenharia de tecidos é um dos maiores desafios a serem superados nas próximas décadas. Como se sabe, aspectos regulatórios são tão importantes como os relacionados à ciência e à tecnologia abordados neste estudo. Entretanto, tal discussão está além do escopo desta pesquisa. Além de mudanças regulatórias, sugerimos que novos estudos busquem antecipar possíveis impactos futuros das tecnologias 3D/4D *bioprinting* na prática médica – especialmente quanto à utilização de tecidos e órgãos bioimpressos em cirurgias – e na pesquisa biomédica, antecipando impactos nas rotinas dos laboratórios, seja pelo uso crescente de modelos bioimpressos, seja pela contínua redução/substituição de animais em pesquisa.

5- Referências Bibliográficas

- Ahn, Sang Hyun; Lee, Junhee; Park, Su A.; Kim, Wan Doo (2016): Three-dimensional bio-printing equipment technologies for tissue engineering and regenerative medicine. Em: *Tissue Eng Regen Med* 13 (6), pág. 663–676. DOI: 10.1007/s13770-016-0148-1.
- Albritton, Jacob L.; Miller, Jordan S. (2017): 3D bioprinting: improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. Em: *Disease models & mechanisms* 10 (1), pág. 3–14. DOI: 10.1242/dmm.025049.
- Almela, Thafar; Al-Sahaf, Sarmad; Brook, Ian M.; Khoshroo, Kimia; Rasoulianboroujeni, Morteza; Fahimipour, Farahnaz et al. (2018): 3D printed tissue engineered model for bone invasion of oral cancer. Em: *Tissue & cell* 52, pág. 71–77. DOI: 10.1016/j.tice.2018.03.009.
- Balls, Michael (2014): Animal experimentation and alternatives: time to say goodbye to the Three Rs and hello to humanity? Em: *ATLA* 42 (5), pág. 327–333.
- Bandyopadhyay, Ashutosh; Dewangan, Vimal Kumar; Vajanthri, Kiran Yellappa; Poddar, Suruchi; Mahto, Sanjeev Kumar (2018): Easy and affordable method for rapid prototyping of tissue models in vitro using three-dimensional bioprinting. Em: *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 38 (1), pág. 158–169. DOI: 10.1016/j.bbe.2017.12.001.
- Boulianne, S.; Klofstad, C. A.; Basson, D. (2011): Sponsor Prominence and Responses Patterns to an Online Survey. Em: *International Journal of Public Opinion Research* 23 (1), pág. 79–87. DOI: 10.1093/ijpor/edq026.
- Brannen, Kimberly C.; Chapin, Robert E.; Jacobs, Abigail C.; Green, Maia L. (2016): Alternative Models of Developmental and Reproductive Toxicity in Pharmaceutical Risk Assessment and the 3Rs. Em: *ILAR journal* 57 (2), pág. 144–156. DOI: 10.1093/ilar/ilw026.
- Brunello, G.; Sivoletta, S.; Meneghello, R.; Ferroni, L.; Gardin, C.; Piattelli, A. et al. (2016): Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. Em: *Biotechnology advances* 34 (5), pág. 740–753. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.03.009.
- Burden, Natalie; Aschberger, Karin; Chaudhry, Qasim; Clift, Martin J. D.; Fowler, Paul; Johnston, Helinor et al. (2017a): Aligning nanotoxicology with the 3Rs: What is needed to realise the short, medium and long-term opportunities? Em: *Regulatory toxicology and pharmacology*: RTP 91, pág. 257–266. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.10.021.
- Burden, Natalie; Aschberger, Karin; Chaudhry, Qasim; Clift, Martin J.D.; Doak, Shareen H.; Fowler, Paul et al. (2017b): The 3Rs as a framework to support a 21st century approach for nanosafety assessment. Em: *Nano Today* 12, pág. 10–13. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.06.007.
- Cheluvappa, Rajkumar; Scowen, Paul; Eri, Rajaraman (2017): Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation. Em: *Pharmacology research & perspectives* 5 (4), pág. 1–14. DOI: 10.1002/prp2.332.
- Colasante, Cesar; Sanford, Zachary; Garfein, Evan; Tepper, Oren (2016): Current Trends in 3D Printing, Bioprosthetics, and Tissue Engineering in Plastic and Reconstructive Surgery. Em: *Curr Surg Rep* 4 (2), pág. 1–14. DOI: 10.1007/s40137-016-0127-4.
- Doke, Sonali K.; Dhawale, Shashikant C. (2015): Alternatives to animal testing: A review. Em: *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 23 (3), pág. 223–229. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.
- Duan, Bin (2017): State-of-the-Art Review of 3D Bioprinting for Cardiovascular Tissue Engineering. Em: *Annals of biomedical engineering* 45 (1), pág. 195–209. DOI: 10.1007/s10439-016-1607-5.
- Fan, Weimiao; Yan, Zheng (2010): Factors affecting response rates of the web survey: A systematic review. Em: *Computers in Human Behavior* 26 (2), pág. 132–139. DOI: 10.1016/j.chb.2009.10.015.
- Famarzi, Negar; Yazdi, Iman K.; Nabavinia, Mahboubeh; Gemma, Andrea; Fanelli, Adele; Caizzone, Andrea et al. (2018): Patient-Specific Bioinks for 3D Bioprinting of Tissue Engineering Scaffolds. Em: *Advanced healthcare materials* 7 (11), 1–9. DOI: 10.1002/adhm.201701347.
- Fleetwood, Gill; Chlebus, Magda; Coenen, Joachim; Dudoignon, Nicolas; Lecerf, Catherine; Maisonneuve, Catherine; Robinson, Sally (2015): Making Progress and Gaining Momentum in Global 3Rs Efforts: How the European Pharmaceutical Industry Is Contributing. Em: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 54 (2), pág. 192–197.
- Gao, Guifang; Cui, Xiaofeng (2016): Three-dimensional bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine. Em: *Biotechnology letters* 38 (2), pág. 203–211. DOI: 10.1007/s10529-015-1975-1.
- Garreta, Elena; Oria, Roger; Tarantino, Carolina; Pla-Roca, Mateu; Prado, Patricia; Fernández-Avilés, Francisco et al. (2017): Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. Em: *Materials Today* 20 (4), pág. 166–178. DOI: 10.1016/j.mattod.2016.12.005.
- Goh, Jen-Yin; Weaver, Richard J.; Dixon, Libby; Platt, Nicola J.; Roberts, Ruth A. (2015): Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013. Em: *Toxicol. Res.* 4 (5), pág. 1297–1307. DOI: 10.1039/C5TX00123D.
- Graham, Melanie L.; Prescott, Mark J. (2015): The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. Em: *European journal of pharmacology* 759, pág. 19–29. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.040.
- Groeber, Florian; Engelhardt, Lisa; Lange, Julia; Kurdyn, Szymon; Schmid, Freia F.; Rücker, Christoph et al. (2016): A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation. Em: *ALTEX* 33 (4), pág. 415–422. DOI: 10.14573/altex.1604041.

- Gungor-Ozkerim, P. Selcan; Inci, Ilyas; Zhang, Yu Shrike; Khademhosseini, Ali; Dokmeci, Mehmet Remzi (2018): Bioinks for 3D bioprinting: an overview. Em: *Biomaterials science* 6 (5), pág. 915–946. DOI: 10.1039/c7bm00765e.
- Ho, Chee Meng Benjamin; Mishra, Abhinay; Lin, Pearlyn Teo Pei; Ng, Sum Huan; Yeong, Wai Yee; Kim, Young-Jin; Yoon, Yong-Jin (2017): 3D Printed Polycaprolactone Carbon Nanotube Composite Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. Em: *Macromolecular bioscience* 17 (4), pág. 1–9. DOI: 10.1002/mabi.201600250.
- Hospodiuk, Monika; Dey, Madhuri; Sosnoski, Donna; Ozbolat, Ibrahim T. (2017): The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. Em: *Biotechnology advances* 35 (2), pág. 217–239. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.006.
- Huang, Ying; Zhang, Xiao-Fei; Gao, Guifang; Yonezawa, Tomo; Cui, Xiaofeng (2017): 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. Em: *Biotechnology journal* 12 (8), pág. 1–16. DOI: 10.1002/biot.201600734.
- Jang, Tae-Sik; Jung, Hyun-Do; Pan, Houwen Matthew; Han, Win Tun; Chen, Shenyang; Song, Juha (2018): 3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering. Em: *Int J Bioprint* 4 (1), pág. 1–28. DOI: 10.18063/ijb.v4i1.126.
- Kaplowitz, Michael D.; Lupi, Frank; Couper, Mick P.; Thorp, Laurie (2012): The Effect of Invitation Design on Web survey Response Rates. Em: *Social Science Computer Review* 30 (3), pág. 339–349. DOI: 10.1177/0894439311419084.
- Keusch, Florian (2012): How to Increase Response Rates in List-Based Web survey Samples. Em: *Social Science Computer Review* 30 (3), pág. 380–388. DOI: 10.1177/0894439311409709.
- Li, Xiaoming; Cui, Rongrong; Sun, Lianwen; Aifantis, Katerina E.; Fan, Yubo; Feng, Qingling et al. (2014): 3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application. Em: *International Journal of Polymer Science* 2014 (24), pág. 1–13. DOI: 10.1155/2014/829145.
- Liu, Mingnan; Kuriakose, Noble; Cohen, Jon; Cho, Sarah (2016): Impact of Web survey Invitation Design on Survey Participation, Respondents, and Survey Responses. Em: *Social Science Computer Review* 34 (5), pág. 631–644. DOI: 10.1177/0894439315605606.
- Löwa, Anna; Jevtic, Marijana; Gorreja, Frida; Hedtrich, Sarah (2018): Alternatives to animal testing in basic and preclinical research of atopic dermatitis. Em: *Experimental dermatology* 27 (5), pág. 476–483. DOI: 10.1111/exd.13498.
- Lücking, Tim H.; Sambale, Franziska; Schnaars, Birte; Bulnes-Abundis, David; Beutel, Sascha; Scheper, Thomas (2015): 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. Em: *Eng. Life Sci.* 15 (1), pág. 57–64. DOI: 10.1002/elsc.201400094.
- Mehrban, Nazia; Teoh, Gui Zhen; Birchall, Martin Anthony (2016): 3D bioprinting for tissue engineering: Stem cells in hydrogels. Em: *International Journal of Bioprinting* 2 (1), pág. 1–14. DOI: 10.18063/IJB.2016.01.006.
- Mohanty, Soumyaranjan; Larsen, Layla Bashir; Trifol, Jon; Szabo, Peter; Burri, Harsha Vardhan Reddy; Canali, Chiara et al. (2015): Fabrication of scalable and structured tissue engineering scaffolds using water dissolvable sacrificial 3D printed moulds. Em: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 55, pág. 569–578. DOI: 10.1016/j.msec.2015.06.002.
- Mohanty, Soumyaranjan; Sanger, Kuldeep; Heiskanen, Arto; Trifol, Jon; Szabo, Peter; Dufva, Marin et al. (2016): Fabrication of scalable tissue engineering scaffolds with dual-pore microarchitecture by combining 3D printing and particle leaching. Em: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 61, pág. 180–189. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.032.
- Mondschein, Ryan J.; Kanitkar, Akanksha; Williams, Christopher B.; Verbridge, Scott S.; Long, Timothy E. (2017): Polymer structure-property requirements for stereolithographic 3D printing of soft tissue engineering scaffolds. Em: *Biomaterials* 140, pág. 170–188. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.005.
- Mori, Arianna de; Peña Fernández, Marta; Blunn, Gordon; Tozzi, Gianluca; Roldo, Marta (2018): 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. Em: *Polymers* 10 (3), pág. 1–26. DOI: 10.3390/polym10030285.
- Mosadegh, Bobak; Xiong, Guanglei; Dunham, Simon; Min, James K. (2015): Current progress in 3D printing for cardiovascular tissue engineering. Em: *Biomedical materials (Bristol, England)* 10 (3), pág. 1–13. DOI: 10.1088/1748-6041/10/3/034002.
- Ng, Wei Long; Yeong, Wai Yee; Naing, May Win (2016): Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. Em: *International Journal of Bioprinting* 2 (1), pág. 53–62. DOI: 10.18063/IJB.2016.01.009.
- Niemi, Steven M.; Davies, Gail F. (2016): Animal Research, the 3Rs, and the “Internet of Things”: Opportunities and Oversight in International Pharmaceutical Development. Em: *ILAR journal* 57 (2), pág. 246–253. DOI: 10.1093/ilar/ilw033.
- O’Connell, Grace; Garcia, Jeanette; Amir, Jamali (2017): 3D Bioprinting: New Directions in Articular Cartilage Tissue Engineering. Em: *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (11), pág. 2657–2668. DOI: 10.1021/acsbomaterials.6b00587.
- Obregon, F.; Vaquette, C.; Ivanovski, S.; Hutmacher, D. W.; Bertassoni, L. E. (2015): Three-Dimensional Bioprinting for Regenerative Dentistry and Craniofacial Tissue Engineering. Em: *Journal of dental research* 94 (9), 143S–152S. DOI: 10.1177/0022034515588885.
- Park, Sang-Hyug; Jung, Chi Sung; Min, Byoung-Hyun (2016): Advances in three-dimensional bioprinting for hard tissue engineering. Em: *Tissue Eng Regen Med* 13 (6), pág. 622–635. DOI: 10.1007/s13770-016-0145-4.
- Petrovcic, Andraz; Petric, Gregor; Lozar Manfreda, Katja (2016): The effect of email invitation elements on response rate in a web survey within an online community. Em: *Computers in Human Behavior* 56, pág. 320–329. DOI: 10.1016/j.chb.2015.11.025.

- Richards, Dylan Jack; Tan, Yu; Jia, Jia; Yao, Hai; Mei, Ying (2013): 3D *Printing* for Tissue Engineering. Em: *Isr. J. Chem.* 53, 805-814. DOI: 10.1002/ijch.201300086.
- Rosania, Kara (2013): Synthetic research tools as alternatives to animal models. Em: *Lab animal* 42 (6), pág. 189–190. DOI: 10.1038/labani.306.
- Saueremann, Henry; Roach, Michael (2013): Increasing *web survey* response rates in innovation research: An experimental study of static and dynamic contact design features. Em: *Research Policy* 42 (1), pág. 273–286. DOI: 10.1016/j.respol.2012.05.003.
- Sears, Nick A.; Seshadri, Dhruv R.; Dhavalikar, Prachi S.; Cosgriff-Hernandez, Elizabeth (2016): A Review of Three-Dimensional Printing in Tissue Engineering. Em: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 22 (4), pág. 298–310. DOI: 10.1089/ten.TEB.2015.0464.
- Singh, Deepti; Singh, Dolly; Han, Sung (2016): 3D *Printing* of Scaffold for Cells Delivery: Advances in Skin Tissue Engineering. Em: *Polymers* 8 (1), pág. 1–17. DOI: 10.3390/polym8010019.
- Stokes, W. S. (2015): Animals and the 3Rs in toxicology research and testing: The way forward. Em: *Human & experimental toxicology* 34 (12), pág. 1297–1303. DOI: 10.1177/0960327115598410.
- Stratton, Scott; Manoukian, Ohan S.; Patel, Ravi; Wentworth, Adam; Rudraiah, Swetha; Kumbar, Sangamesh G. (2018): Polymeric 3D Printed Structures for Soft-Tissue Engineering. Em: *J. Appl. Polym. Sci.* 135 (24), pág. 1–13. DOI: 10.1002/app.45569.
- Tarassoli, Sam P.; Jessop, Zita M.; Al-Sabah, Ayesha; Gao, Neng; Whitaker, Sairan; Doak, Shareen; Whitaker, Iain S. (2018): Skin tissue engineering using 3D *bioprinting*: An evolving research field. Em: *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS* 71 (5), pág. 615–623. DOI: 10.1016/j.bjps.2017.12.006.
- van Mol, Christof (2017): Improving *web survey* efficiency: the impact of an extra reminder and reminder content on *web survey* response. Em: *International Journal of Social Research Methodology* 20 (4), pág. 317–327. DOI: 10.1080/13645579.2016.1185255.
- Vanderburgh, Joseph; Sterling, Julie A.; Guelcher, Scott A. (2017): 3D *Printing* of Tissue Engineered Constructs for In Vitro Modeling of Disease Progression and Drug Screening. Em: *Annals of biomedical engineering* 45 (1), pág. 164–179. DOI: 10.1007/s10439-016-1640-4.
- Vries, Rob B. M. de; Leenaars, Marlies; Tra, Joppe; Huijbregtse, Robbertjan; Bongers, Erik; Jansen, John A. et al. (2015): The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review. Em: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 9 (7), pág. 771–778. DOI: 10.1002/term.1703.
- Whitford, William G.; Hoying, James B. (2016): A bioink by any other name: terms, concepts and constructions related to 3D *bioprinting*. Em: *Future science OA* 2 (3), 1-5. DOI: 10.4155/fsoa-2016-0044.
- Zhang, Xiaoying; Zhang, Yangde (2015): Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional *Bioprinting*. Em: *Cell biochemistry and biophysics* 72 (3), pág. 777–782. DOI: 10.1007/s12013-015-0531-x.
- Zhao, Xinru; Liu, Libiao; Wang, Jiayin; Xu, Yufan; Zhang, Weiming; Khang, Gilson; Wang, Xiaohong (2016): In vitro vascularization of a combined system based on a 3D *printing* technique. Em: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 10 (10), pág. 833–842. DOI: 10.1002/term.1863.
- Zhu, Wei; Ma, Xuanyi; Gou, Maling; Mei, Deqing; Zhang, Kang; Chen, Shaochen (2016): 3D *printing* of functional biomaterials for tissue engineering. Em: *Current opinion in biotechnology* 40, pág. 103–112. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.03.014.
- Zopf, David A.; Hollister, Scott J.; Nelson, Marc E.; Ohye, Richard G.; Green, Glenn E. (2013): Bioresorbable Airway Splint Created with a Three-Dimensional Printer. Em: *New England Journal of Medicine* 368 (21), pág. 2043–2045. DOI: 10.1056/NEJMc1206319.



