



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**BIOPRINTING 3D: UMA ALTERNATIVA À EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL EM FARMACOTOXICOLOGIA**

Trabalho submetido por

Jessica Miranda de Almeida

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

dezembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**BIOPRINTING 3D: UMA ALTERNATIVA À EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL EM FARMACOTOXICOLOGIA**

Trabalho submetido por

Jessica Miranda de Almeida

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Maria Deolinda Ferreira dos Santos Auxtero

dezembro de 2020

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais por todo o amor e apoio incondicional, por estarem disponíveis sempre que eu precisasse, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse seguir os meus sonhos e proporcionar-me um futuro melhor. Obrigada por cuidarem de mim e me tornarem num ser humano melhor e mais completo!

Ao meu irmão, pelo seu jeito carinhoso, mas ao mesmo tempo despreocupado e brincalhão, que tanto me irrita quanto me faz rir e desanuviar. Obrigada por seres uma lufada de ar fresco!

Ao Rafael, ao companheiro de uma vida, pelo amor, pelo constante apoio, motivação e força para continuar sempre a trabalhar e a lutar por fazer sempre mais e melhor, por não me deixares desistir e por estares sempre lá para me amparar. Obrigada por seres a voz da minha consciência e, acima de tudo, por seres o meu porto de abrigo!

À Inês, a minha companheira de todas as horas e melhor amiga, a melhor pessoa que a faculdade me deu. Obrigada pelas gargalhadas e por poder contar contigo para tudo!

Aos meus sogros, Flor e Vítor, por me darem abrigo e me tratarem como uma filha. Estarei para sempre grata!

A todos os professores que ao longo do meu percurso académico transmitiram todos os seus conhecimentos e contribuíram para a minha formação académica, em particular à minha orientadora Prof. Doutora Maria Deolinda Auxtero pela ajuda, paciência e todo o apoio durante a realização desta monografia.

Obrigada a todos que, de uma maneira ou de outra, cruzaram o meu caminho e contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Resumo

Modelos animais têm sido utilizados em ensaios experimentais com o objetivo de aumentar o conhecimento que se tem acerca de potenciais fármacos e contribuir para encontrar respostas para questões biológicas e biomédicas que vão surgindo. No entanto, urge uma preocupação com o bem-estar dos animais utilizados nestes ensaios, e a crescente consciência do conceito “Direitos dos Animais” veio aumentar o foco sobre questões éticas.

Os modelos animais são, ao momento, considerados inadequados para fazer uma previsão fiel da toxicidade e eficácia dos fármacos a ser estudados, conduzindo a uma necessidade iminente da utilização de novas estratégias *in vitro* na fase pré-clínica com capacidade de representar melhor as condições *in vivo* e facilitar na investigação sistematizada de candidatos a novos medicamentos.

Os avanços recentes na bioimpressão 3D têm demonstrado a manipulação precisa de células e biomateriais, tornando-a uma tecnologia promissora na construção de modelos *in vitro* de tecidos/órgãos e dispositivos na triagem de medicamentos.

Modelos *in vitro* de tecidos/órgãos são plataformas úteis com potencial para facilitar ensaios clínicos na descoberta e desenvolvimento de fármacos. O objetivo principal ao desenvolver modelos tridimensionais é reproduzir funções fisiologicamente relevantes que normalmente requerem sistemas mais complexos. Tecidos/órgãos bioimpressos revelam grande potencial na triagem de novos compostos ou em estudos de toxicidade, já que a complexidade espacial e química inerente a tecidos e órgãos nativos pode ser recriada.

Palavras-chave: bioimpressão 3D, toxicidade, experimentação animal, alternativa

Abstract

Animal models have been used in experimental trials to increase knowledge about potential drugs and help to find answers to emerging biological and biomedical questions. However, a concern for the welfare of the animals used in these trials is urgent, and the growing awareness of the concept "Animal Rights" has increased the focus on ethical issues.

Animal models are currently considered inadequate to accurately predict the toxicity and efficacy of the drugs to be studied, leading to an imminent need for the use of new *in vitro* strategies in the pre-clinical phase with the capacity to better represent *in vivo* conditions and facilitate systematic research of candidates for new drugs.

Recent advances in 3D bioprinting have demonstrated the precise manipulation of cells and biomaterials, making it a promising technology for building *in vitro* models of tissues/organs and devices in drug screening.

In vitro tissue/organism models are useful platforms with the potential to facilitate clinical trials in drug discovery and development. The main objective in developing three-dimensional models is to reproduce physiologically relevant functions that normally require more complex systems. Bioprinted tissues/organs show great potential in screening new compounds or in toxicity studies, as the spatial and chemical complexity inherent in native tissues and organs can be recreated.

Keywords: 3D bioprinting, animal testing, alternative, toxicity

Índice Geral	
RESUMO	7
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	9
I. INTRODUÇÃO	11
II. DESENVOLVIMENTO	13
1. BIOPRINTING 3D	13
1.1 MODELOS DE BIOPRINTING 3D	15
1.1.1 <i>Bioprinting a Jato</i>	15
1.1.2 <i>Bioprinting por extrusão</i>	17
1.1.3 <i>Bioprinting a Laser</i>	18
1.1.4 <i>Outras Técnicas: Bioprinting por Estereolitografia</i>	19
2 BIOMATERIAIS	21
2.1 BIOINK	22
2.1.1 <i>Polímeros</i>	23
2.1.2 <i>Células</i>	26
3. BIOPRINTING 3D NA ÁREA FARMACÊUTICA	29
3.1. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA TÉCNICA	29
3.2 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	32
3.2.1 <i>Veiculação de fármacos</i>	33
3.2.2 <i>Seleção do Alvo Terapêutico</i>	32
3.2.3 <i>Avaliação da Eficácia</i>	34
3.2.4 <i>Análise da Toxicidade</i>	35
3.2.5 <i>Ensaio de Alto Desempenho</i>	37
3.2.6 <i>Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME)</i>	37
4. APLICAÇÕES EM FARMACOTOXICOLOGIA: ÓRGÃOS 3D	39
4.1. FÍGADO	39
4.2 RIM	40
4.3 PELE	41
4.4 INTESTINO	43
4.5 VASCULARIZAÇÃO	44
5. PERSPETIVAS FUTURAS	46

6. CONCLUSÃO.....	49
7. BIBLIOGRAFIA	50

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema do processo de Bioprinting 3D	14
Figura 2 – Principais modelos de Bioprinting 3D e aplicações na Descoberta e Desenvolvimento de Medicamentos.....	15
Figura 3 – Bioprinting a Jato	16
Figura 4 – Bioprinting de Extrusão	18
Figura 5 - Bioprinting a Laser	19
Figura 6 – Bioprinting por Estereolitografia	20
Figura 7 – Processo formação bioink.	23
Figura 8 – (A) Corte Histológico de rim nativo; (B1) Corte Histológico de rim bioimpresso 1 semana em meio de cultura; (B2) Corte histológico de rim bioimpresso 2 semanas em meio de cultura.	41
Figura 9 - Coloração histológica da pele <i>in vivo</i> (A) e estrato epidérmico/dérmico construído <i>in vitro</i> (B).	43
Figura 10 – (A) Corte Histológico do epitélio intestinal 3D; (B,C) Corte histológico epitélio intestinal 3D após exposição a doses tóxicas de indometacina	44

Lista de Abreviaturas

2D - Bidimensional

3D – Tridimensional

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CYP450 – Citocromo 450

ISO – International Standart Organization

MEC – Matriz Extracelular

RM - Ressonância Magnética

RNA – Ácido Ribonucleico

TC – Tomografia Computorizada

I. Introdução

Durante o processo de desenvolvimento de um novo medicamento, recorre-se a ensaios de eficácia *in vitro*, para selecionar os fármacos mais eficazes, e a ensaios de toxicidade *in vitro* para excluir compostos com toxicidades inaceitáveis, auxiliando na otimização do menos tóxico. Estes ensaios *in vitro* reduzem o número de compostos a serem testados no processo subsequente (Peng et al., 2017).

O processo de lançamento de um novo fármaco para o mercado é, essencialmente, composto por duas fases: a fase pré-clínica e a fase clínica. (Amir-Aslani & Mangematin, 2010)

A fase pré-clínica envolve a identificação e validação do alvo terapêutico e do composto molecular a ser estudado, bem como o desenvolvimento pré-clínico, onde são realizados ensaios *in vivo*, e estudado o perfil farmacológico e toxicológico do potencial fármaco. Na fase clínica desenvolve-se o fármaco após a sua aprovação na fase pré-clínica, incluindo ensaios em humanos, onde são estudados o perfil de eficácia e segurança do medicamento, efeitos adversos, farmacocinética e farmacodinâmica. (Grabowski, Vernon, & DiMasi, 2002). Na fase pré-clínica os modelos animais são frequentemente utilizados para prever a biodisponibilidade, eficácia e segurança do composto molecular, no entanto, diferenças entre espécies podem levar à disparidade quer na expressão de enzimas metabólicas e transportadores, (Jones et al., 2016; Musther, Olivares-Morales, Hatley, Liu, & Rostami Hodjegan, 2014; Peters, Jones, Ungell, & Hatley, 2016), quer na antecipação da eficácia e segurança de novos medicamentos (Massa et al., 2017), o que resulta numa previsão deficiente do impacto que o novo fármaco irá ter no organismo humano.

Atualmente, há um crescente reconhecimento de que os modelos animais não são, muitas vezes, preditivos da toxicidade dos fármacos em humanos, devido, essencialmente, às disparidades na expressão genética (Kolesky, Homan, Skylar-Scott, & Lewis, 2018). Existem também preocupações éticas associadas aos modelos animais que conduzem à necessidade de criar novas estratégias, que não só colmatem as disparidades nos resultados dos ensaios clínicos, como também minorem a dependência que existe nos modelos pré-clínicos (Nguyen, Jr, Lee, Biology, & Lilly, 2017).

Torna-se, portanto, fulcral integrar estratégias no início do processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, (Rosen & Aribat, 2005) de modo a que

consigamos prever fielmente a biodisponibilidade do medicamento, através de veículos com maior grau de semelhança aos humanos, e conseqüentemente a sua toxicidade.

Uma vez que o desenvolvimento clínico em si contribui para quase 60% do custo total, bem como a maior parte do tempo do ciclo de descoberta, reduzir a percentagem de vieses dos candidatos a medicamentos nessa fase constitui o maior desafio e oportunidade para pesquisa e desenvolvimento farmacêutico (Paul et al., 2010).

Os avanços na impressão tridimensional (3D) permitem que o conjunto direto de células e materiais de matriz extracelular originem modelos celulares *in vitro* na biologia 3D, o estudo patogénico de doenças e a descoberta de novos medicamentos (Zhao et al., 2014). A impressão 3D de tecidos e/ou órgãos (*Bioprinting 3D*) é uma área emergente de pesquisa que consiste na construção de tecidos ou órgãos com arquitetura hierárquica (Gungor-Ozkerim, Inci, Zhang, Khademhosseini, & Dokmeci, 2018), e que pode ser considerada como recurso alternativo à experimentação animal, não só pela redução dos custos dos ensaios pré-clínicos, mas mais importante, pela precocidade com que se consegue prever o poder toxicológico de um composto (Peng et al., 2017).

II. Desenvolvimento

1. Bioprinting 3D

O Bioprinting 3D surgiu da interseção entre química, biologia e tecnologia (Parak et al., 2019).

O termo impressão tridimensional (3D) foi definido pela *International Standard Organization* (ISO) como: “construção de objetos através da deposição de um material usando uma cabeça de impressão, bocal ou outra tecnologia de impressora” (Jamróz, Szafraniec, Kurek, & Jachowicz, 2018).

O *Bioprinting* consiste no posicionamento sincronizado de biomateriais e células vivas, aglomeradas camada por camada de modo a fabricar construções 3D (Ozbolat, 2015). É uma técnica de alta precisão na colocação espacial e temporal de células vivas, proteínas, ADN, fármacos, fatores de crescimento e outras substâncias bioativas, com o objetivo de orientar a construção e formação de novos tecidos. (Peng et al., 2017)

O processo de *Bioprinting* 3D é composto por três fases distintas. A primeira fase corresponde à fase de pré-processamento e inclui todos os detalhes de planejamento que antecedem a produção do tecido a imprimir. A fase de pré-processamento inclui imagens - obtidas através de Tomografia Computorizada (TC), Ressonância Magnética (RM), etc. – que auxiliam na análise da estrutura anatômica do tecido alvo e tradução dos dados de imagem de um projeto para *bioprinting*. (Campbell, Williams, Ivanova, & Garrett, 2012) Nesta primeira fase são, também, utilizados programas de *software* especializados que transformam dados de imagem em camadas transversais à escala pretendida, para que o dispositivo de *bioprinting* tenha a capacidade de os unir camada por camada (Figura 1). (Campbell et al., 2012).

A segunda fase é a fase de processamento, que engloba todas as etapas envolvidas na construção e fabrico real do tecido a imprimir. A complexidade desta fase surge aquando da seleção do modelo específico para impressão e da formulação dos biomateriais a utilizar. Cada escolha tem um impacto significativo no produto final, e tem o potencial para alterar a interação dos componentes individuais, afetando o resultado final (Y. S. Zhang et al., 2017).

Por último, a fase pós-processamento engloba todas as etapas prévias à maturação do tecido bioimpresso e utilização *in vivo*. A maturação do tecido ocorre, na maioria das aplicações do *Bioprinting 3D*, dentro de um biorreator. O biorreator utilizado tem de ter a capacidade de recriar adequadamente o ambiente *in vivo* para vários tipos de tecido, de

modo a que não haja perda de viabilidade tecidual durante o período de maturação. (Bishop et al., 2017)

Em suma, *bioprinting* é uma técnica de construção de materiais biofuncionais impressos camada por camada em substratos, quando incorporados em biomateriais compatíveis (Arslan-Yildiz et al., 2016). O processo refere-se a células de impressão e padronização, ou outras entidades biológicas, depositadas num substrato ou tecido através de um sistema de dispensa automatizado, garantindo que vários tipos de células se mantenham unidas quando dispensados em materiais biocompatíveis, formando estruturas funcionais tridimensionais. (Derby, 2012; Malda et al., 2013). Biomateriais compostos por células, material de estrutura base e outros componentes necessários são chamados de “*bioink*” (Marga et al., 2012).

Um dos principais objetivos do *bioprinting* é utilizar células vivas e biomateriais para gerar tecidos 3D que sintetizem aspetos-chave da arquitetura e função de um tecido ou órgão nativo. Com condicionamento *in vitro* ou *in vivo* adequado, as células dentro dessas estruturas podem responder a sinais solúveis e mecânicos estabelecendo interações célula-célula e matriz celular que mimetizam alguns aspetos do tecido nativo (Griffith, Wells, & Stolz, 2014)

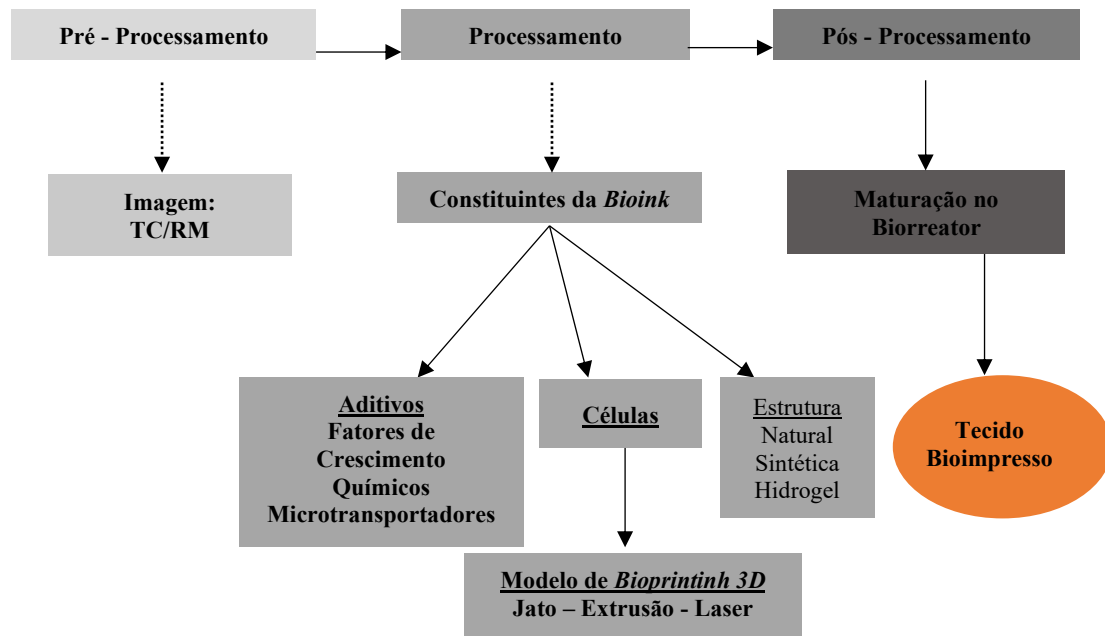


Figura 1 – Esquema do processo de Bioprinting 3D. Adaptado de Bishop et al (2017)

1.1 Modelos de Bioprinting 3D

O sucesso da engenharia tecidual depende essencialmente da capacidade de formular estruturas 3D complexas que se assemelhem fielmente aos tecidos vivos nativos. Portanto, as estratégias utilizadas para projetar e criar arquitetura e topografia das camadas de biomaterial são um aspeto vital da engenharia funcional de tecidos e órgãos. Estruturas funcionais podem ser construídas seguindo uma abordagem vertical ou horizontal (Lu, Li, & Chen, 2013).

Segundo o método de deposição e padronização de materiais biológicos, existem três tipos principais de modelos de *Bioprinting 3D*, são eles o *Bioprinting* a jato ou gotículas, por extrusão e a laser. A Figura 2 mostra os três principais modelos de *Bioprinting 3D*, bem como a sua aplicação na construção de tecidos na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (Jamróz et al., 2018). Estes modelos podem ser utilizados de forma isolada ou em conjunto de modo a alcançar a construção de tecido ou órgão vivo pretendidos. (Ashley N. Leberfinger, Dino J. Ravnicek, Aman Dhawan, 2017).



Figura 2 – Principais modelos de Bioprinting 3D e aplicações na Descoberta e Desenvolvimento de Medicamentos. Adaptado de Gungor-Ozkerim et al., (2018)

1.1.1 Bioprinting a Jato

Bioprinting a Jato, também conhecido como *Bioprinting* por Gotículas é a técnica de *bioprinting* mais utilizada, quer em aplicações biológicas, quer não-biológicas (Murphy & Atala, 2014). Deriva das impressoras convencionais de jato de tinta bidimensionais (2D). Nesta técnica de *bioprinting* sem contacto, a reconstrução da

imagem é baseada na criação e posicionamento preciso de gotículas de *bioink* num substrato, controlado por computador (Satpathy et al., 2018b; Saunders & Derby, 2014). A *bioink* presente nos cartuchos de impressão é composta por biomateriais, como células vivas, ADN, RNA, etc.

Neste modelo de *bioprinting*, cada gota de *bioink* contém entre 10^4 - 30^4 células e podem ser formadas a partir de duas estratégias: impressão contínua a jato (piezoelétrico) e impressão por controlo de gotículas (térmico) (Figura 3) (Katja Hölzl et al., 2016).

Na impressão por controlo de gotículas a cabeça de impressão é aquecida com o objetivo de produzir pulsos de pressão que impulsionam as gotículas a sair do bocal. O aquecimento local origina uma bolha na câmara de *bioink* e ejeta uma pequena gota (X. Zhang & Zhang, 2015).

Na impressão piezoelétrica, existe um cristal piezoelétrico, que, em resposta à tensão aplicada, induz uma rápida alteração de forma, criando uma onda acústica dentro da cabeça de impressão. Esta onda acústica ajuda a fracionar o líquido na cabeça de impressão em muitas gotículas e a sua ejeção em intervalos regulares (Tekin, Smith, & Schubert, 2008). A combinação de múltiplos ejetores acústicos no formato de uma matriz ajustável, facilita a impressão, simultânea, de diferentes tipos de células e biomateriais (Tasoglu & Demirci, 2013).

As vantagens da impressão a jato de tinta incluem: baixo custo, devido à semelhança da impressora com uma convencional; alta velocidade de impressão, conferida pela capacidade de realizar vários trabalhos paralelos; e, alta viabilidade celular (entre 80% a 90%) (Mandrycky, Wang, Kim, & Kim, 2016).

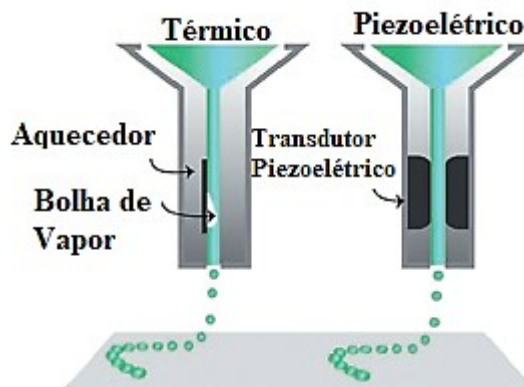


Figura 3 – Bioprinting a Jato. Adaptado de Das & Basu (2019)

1.1.2 Bioprinting por extrusão

O *bioprinting* baseado em extrusão utiliza um sistema robótico controlado por computador na distribuição contínua de filamentos de *bioink*. (Ozbolat & Hospodiuk, 2016)

Neste modelo de *bioprinting*, a *bioink* é colocada em seringas de plástico descartável e é dispensada pneumática ou mecanicamente (em pistão ou parafuso rotativo) sob substratos estéreis (Matai, Kaur, Seyedsalehi, McClinton, & Laurencin, 2020). A *bioink* é pressionada na forma de filamentos cilíndricos carregados de células que, posteriormente são depositados nas estruturas 3D desejadas. A deposição contínua confere maior integridade estrutural durante a construção rápida (H. Cui, Nowicki, Fisher, & Zhang, 2017).

O modelo de bioimpressão por extrusão permite a impressão de células vivas em posições específicas do tecido ou órgão alvo, encapsulando-as simultaneamente num hidrogel. Existe na opção de sistema pneumático, de pistão e parafuso (Figura 4), e é considerado o modelo atual mais promissor na construção de tecido 3D ou órgãos de tamanho e forma clinicamente relevantes (Pati, Gantelius, & Svahn, 2016).

Os sistemas de extrusão atuais têm algumas diferenças entre si (Khalil e Sun, 2007). Bocais pneumáticos alimentados por gases comprimidos suportam maior viscosidade, mas têm dificuldade em controlar precisamente a massa depositada. Os bocais à base de parafusos podem imprimir sem ar de entrada e são muito mais baratos, mas apresentam problemas na dispensa a alta viscosidade.

Este modelo de *bioprinting* apesar de permitir a impressão de maior variedade de materiais, expõe as células encapsuladas a elevadas pressões, podendo reduzir a viabilidade celular (Khalil & Sun, 2007; Murphy & Atala, 2014).

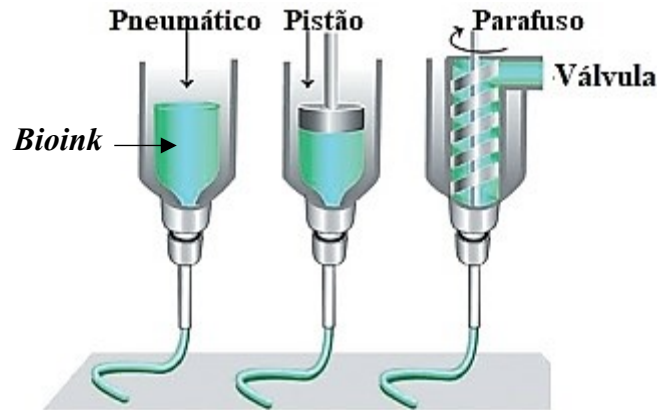


Figura 4 – Bioprinting de Extrusão. Adaptado de Das & Basu (2019)

1.1.3. Bioprinting a Laser

O *Bioprinting* assistido por laser utiliza uma fonte de laser pulsado, uma camada de absorção e uma camada onde são posicionadas múltiplas células e componentes biológicos, que posteriormente serão impressos sob uma superfície estéril, formando tecidos ou órgãos vivos em 3D (Figura 5) (Catros et al., 2011).

A camada composta por material biológico engloba uma faixa que contém uma camada de absorção de energia na parte superior e uma camada de *bioink* suspensa na parte inferior. Durante a impressão, um pulso laser focado é aplicado de modo a estimular uma pequena área da camada de absorção. Este laser pulsado vaporiza uma parte da camada do doador, criando uma bolha de alta pressão na interface da camada de *bioink* e estimulando a *bioink* que está suspensa (Mandrycky et al., 2016). A gota de *bioink* que está suspensa é recolhida no substrato recetor e, posteriormente, cruzada com outras.

Comparativamente à impressão a jato, a impressão assistida por laser consegue evitar o contato direto entre o dispensador e a *bioink*. Este método de impressão sem contato evita que as células sofram stress mecânico, originando elevada viabilidade celular (geralmente superior a 95%). Outra vantagem, do *bioprinting* a laser é que este também tem a capacidade de imprimir materiais altamente viscosos e maior variedade de *bioink*. Apesar destas características serem altamente promissoras, este modelo apresenta algumas limitações como o facto dos efeitos colaterais da exposição celular a energia laser ainda não serem totalmente compreendidos e o custo dos díodos de laser com alta resolução e intensidade, comparativamente a outros modelos de *bioprinting*, limitando a adoção da técnica (Mandrycky et al., 2016).

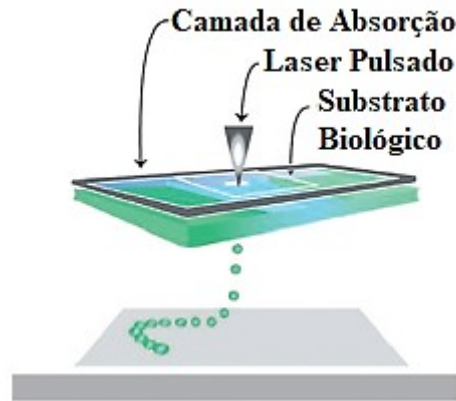


Figura 5 - Bioprinting a Laser. Adaptado de Das & Basu (2019)

1.1.4 Outras Técnicas: *Bioprinting* por Estereolitografia

Embora os três métodos de impressão referidos anteriormente sejam os mais comumente utilizados, continuam a ser investigadas novas metodologias de impressão e a incorporar novas modificações nos modelos já existentes.

Uma dessas modificações foi introduzida no *bioprinting* de extrusão pneumática, que em vez de se imprimir o tecido diretamente, Miller et al. (2012) utilizaram uma seringa controlada pneumaticamente para imprimir vidro de açúcar derretido com o formato de uma rede vascular desejada. Uma vez impressa, esta rede vascular foi incorporada numa grande variedade de hidrogéis, sendo dissolvida e formando canais abertos dentro dos tecidos que interestava. Esta abordagem comprometeu a capacidade de colocar cuidadosamente a deposição celular dentro da matriz, em contrapartida permitiu a construção de uma rede vascular com uma complexidade não atingida até então num tecido sintético.

A estereolitografia foi também modificada de modo a que fosse possível bioimprimir (Figura 6) (Gou et al., 2014). Como o *bioprinting* a laser, as bioimpressoras de estereolitografia utilizam luz para solidificar seletivamente a *bioink* num processo de camada por camada. (Gauvin et al., 2012).

O método de bioimpressão por estereolitografia recorre à fotopolimerização, processo no qual uma luz ultravioleta (UV) ou laser é direcionado num padrão definido sobre uma camada de polímeros em estado líquido, cruzando-os e formando uma camada rígida. (Guvendiren, Molde, Soares, & Kohn, 2016) Como a polimerização é feita camada por camada, a superfície de impressão pode ser de dimensão reduzida na solução de

polímeros, permitindo vários ciclos da construção de uma estrutura tridimensional. (Guvendiren et al., 2016)

O *bioprinting* por estereolitografia consegue imprimir modelos com padrões mais complexos projetados num plano de impressão, num tempo de impressão menor ou igual aos modelos mais comuns. Como resultado, a impressora só precisa de um ponto móvel vertical, simplificando o controlo sobre a impressora (Gauvin et al., 2012).

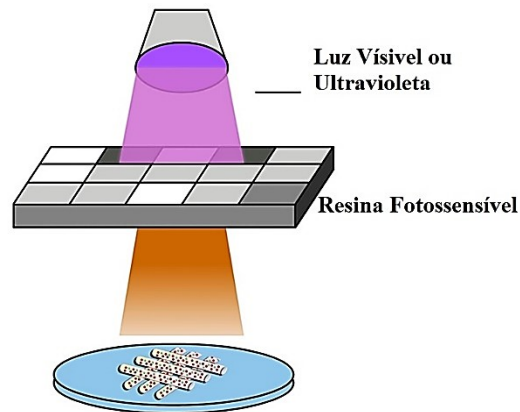


Figura 6 – Bioprinting por Estereolitografia. Adaptado de Mandrycky et al., (2016)

2 Biomateriais

As células do corpo são reguladas por uma série de microambientes internos, envolvendo fluidos biológicos e matrizes extracelulares. Materiais adequados com propriedades miméticas das matrizes extracelulares nativas permitem que as células madurem, proliferem, comuniquem e transformem naturalmente *in vivo*, e podem ser usadas como matrizes ideais para uma ampla gama de aplicações biomédicas e farmacêuticas (Liu et al., 2018; Rabelink et al., 2017).

A bioimpressão de tecidos envolve, frequentemente, a utilização de materiais com propriedades bem definidas como veículo para o crescimento celular. Deste modo, a engenharia de materiais pode ser aplicada para modular interações célula-biomaterial. No entanto, a principal função dos materiais bioimprimíveis não é, apenas, a gestão de interações específicas com uma célula ou tecido, mas também fornecer suporte para formação de tecidos. (Hamidi, Azadi, & Rafiei, 2008)

A seleção dos biomateriais depende de uma variedade de fatores, entre os quais, o tipo de impressão, tecido de interesse e processo biológico a modelar. Para construir modelos de tecido *in vitro* para modelagem de doenças e desenvolvimento de medicamentos é, ainda, necessário desenvolver materiais com elevada sintonia nas propriedades mecânicas, químicas e biológicas de modo a recapitular a composição da proteína, assim como o ambiente do tecido nativo (X. Ma et al., 2018).

Os biomateriais podem ser de origem natural ou sintética. Materiais naturalmente derivados são atraentes devido à complexidade dos seus constituintes biofísicos e bioquímicos que mimetizam de perto a matriz extracelular nativa. Essas propriedades miméticas intrínsecas facilitam a adesão celular, a proliferação, a diferenciação, a migração e a biocompatibilidade (Verneti et al., 2017). No entanto, apesar da vantagem inerente da biocompatibilidade e, muitas vezes, bioatividade, é difícil adaptar a estrutura, propriedades reológicas e o comportamento durante a impressão (Kolesky et al., 2018). Em contrapartida, os materiais sintéticos são altamente definidos e são facilmente reprodutíveis para controlar um ampla variedade de propriedades, incluindo a taxa de degradação, sensibilidade celular, resistência mecânica e estrutural (Verneti et al., 2017).

2.1 *Bioink*

Simplificadamente, *bioink* é o material que é impresso em camadas durante o processo de *bioprinting*. A seleção da *bioink* adequada é um passo fundamental para um *bioprinting* bem-sucedido. As *bioink* são formadas por biomateriais naturais e sintéticos com variadas propriedades, como por exemplo a biocompatibilidade, garantindo a impressão e funcionalidade a longo prazo após a deposição (X. Ma et al., 2016), nomeadamente material celular, aditivos (fatores de crescimento, moléculas sinalizadoras, etc.), e uma estrutura de suporte. (Bishop et al, 2017)

As propriedades da *bioink* exigidas dependem da estratégia de impressão e do tipo de tecido alvo. A impressão a jato de tinta requer baixas viscosidades e baixa condutividade térmica de modo a evitar a obstrução do bocal e danos térmicos, respetivamente (Chimene, Lennox, Kaunas, & Gaharwar, 2016). Contrariamente ao *bioprinting* a jato, a impressão por extrusão e o *bioprinting* a laser apresentam melhor tolerabilidade para maiores viscosidades. (Chimene et al., 2016; Malda et al., 2013)

Relativamente à concentração da *bioink*, deve haver um equilíbrio entre o fornecimento de propriedades estruturais básicas sem comprometer a viabilidade celular, permitindo, assim, a migração e difusão celular. (Panwar & Tan, 2016)

No *Bioprinting* 3D são comumente utilizadas duas classes de *bioinks*. A primeira classe é constituída por polímeros cicatrizáveis, que podem ser extrudados através de um processo térmico e utilizados na construção da estrutura do tecido ou órgão (Park, Jang, Lee, & Cho, 2016). Após a construção das estruturas, as células são semeadas para que madurem e multipliquem, originando construções teciduais ou utilizadas como suporte para o implante de outras células (M. O. Wang et al., 2014). A segunda classe engloba materiais com capacidade para armazenar uma grande quantidade de água (superior a 99%) e fornecer um ambiente favorável para as células (Melchels et al., 2012). À segunda classe de materiais pertencem os hidrogéis, que podem ser usados isoladamente ou em conjunto com outros componentes, como fármacos e biomoléculas, e têm como principal função encapsular células vivas (Figura 7) (Kaigler, Silva, & Mooney, 2013). As biomoléculas utilizadas em conjunto com o hidrogel podem ser fatores de crescimento, geralmente referidos como grupo de proteínas ou hormonas esteroides, que estimulam a diferenciação celular, proliferação, sobrevivência e regeneração do tecido (Gungor-Ozkerim et al., 2018).

Em suma, o material utilizado como *bioink* é fundamental para o fornecimento de um conjunto de atributos bioquímicos (ou seja, quimiocinas, fatores de crescimento, fatores de adesão ou proteínas de sinalização) e físicos (tais como, fluxo intersticial, propriedades mecânicas e estruturais da matriz extracelular) que promovam um ambiente favorável à sobrevivência celular, motilidade e diferenciação (Griffith & Naughton, 2002).

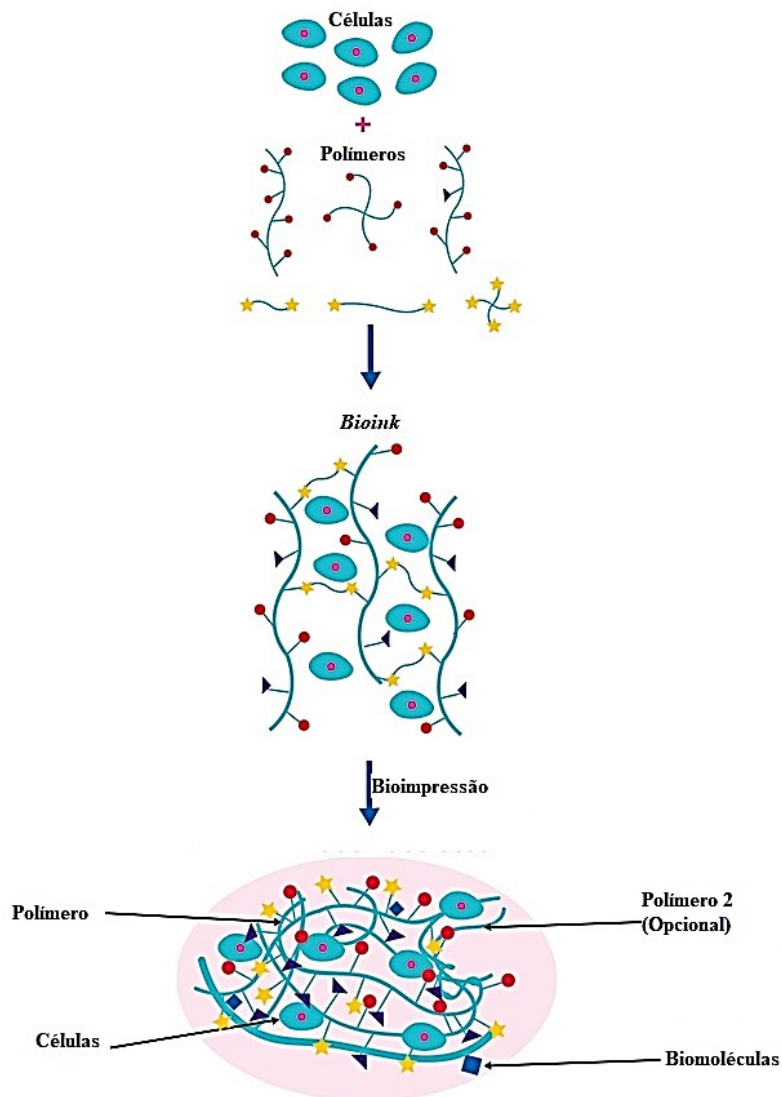


Figura 7 – Processo formação bioink. Adaptado de Gungor-Ozkerim et al., (2018)

2.1.1. Polímeros

Polímeros são macromoléculas compostas por moléculas de menores dimensões e idênticas, conexas por ligações covalentes (Causa et al., 2006). Os monómeros,

moléculas de baixa massa molecular, geram a macromolécula polimérica através de reações de polimerização.

Os polímeros podem ser divididos em grupos naturais e sintéticos de acordo com sua origem.

Os polímeros naturais, também chamados de biopolímeros, possuem diferentes propriedades e vantagens relacionadas com a sua composição físico-química, podendo estas ser ajustadas ao tipo de tecido e células-alvo (Puppi et al., 2012). A maioria dos polímeros naturais é solúvel em água e dotada de algumas propriedades biológicas e fisiológicas comuns, nomeadamente serem flexíveis como tecidos e órgãos moles, fáceis de encapsular e realizar transplante celular, e fáceis de manusear e remodelar (X. Wang, 2019). Nos biopolímeros há a necessidade de planejar cuidadosamente a estrutura do tecido ou órgão, de modo a que as células tenham espaço suficiente para proliferar e migrar (Guvendiren & Burdick, 2013), tendo também em consideração as propriedades reológicas, como a viscosidade e a porosidade (Malda et al., 2013). Os polímeros naturais têm a vantagem de mimetizar com maior precisão o microambiente natural das células, no entanto a variabilidade presente num lote é muito maior, dificultando a reprodutibilidade do ensaio (Case, Lobo, & Ginestra, 2019).

Atualmente, o *bioprinting* utiliza uma enorme variedade quer de polímeros naturais quer de semissintéticos, como colagénio e fibrinogénio (Walters & Stegemann, 2014), gelatina (Malda et al., 2013), alginato (Jeon & Alsberg, 2013) e membranas poliméricas (Matriz extracelular – MEC - contendo proteínas como fibronectina, laminina e colagénio) (Poldervaart et al., 2014).

Durante o processo de bioimpressão de órgãos 3D, os diferentes polímeros têm funções distintas. A maioria dos polímeros naturais, que são utilizados como os principais integrantes da *bioink*, têm as seguintes funções: (1) fornecer células e agentes de suporte, como matriz extracelular; (2) construir redes vasculares, neurais e linfáticas como substratos semipermeáveis para nutrientes, gases (por exemplo, oxigénio), metabolitos e sinal biológico; (3) orientar histogénese homogénea e heterogénea, e organogénese de forma predefinida; e (4) promover a maturação de tecidos e órgãos em condições bioquímicas e biofísicas específicas. (Liu et al., 2018)

Os polímeros sintéticos são polímeros naturais com variações na sua síntese. Estas variações visam, por exemplo, resolver o problema da reprodutibilidade do ensaio, pois os polímeros sintéticos caracterizam-se por apresentar estrutura e composição exatas entre amostras.

As propriedades dos polímeros sintéticos dependem de muitos fatores, como condições de processamento, pesos moleculares, distribuições de monómeros, cadeia estrutural (por exemplo, tamanho, geometria, intra/interligações e ramificação), e a presença de aditivos (X. Wang, 2019). São exemplo de polímeros sintéticos a policaprolactona, polietilenoglicol e derivados, ácido polilático, ácido laticoglicólico e ligações peptídicas (Case, Lobo, & Ginestra, 2019).

Os polímeros sintéticos são utilizados com os seguintes objetivos: (1) melhorar o manuseio multicelular ou alocar no espaço mimetizando as unidades naturais; (2) melhorar as propriedades mecânicas da rede vascular e neural; (3) controlar (ou completar) funções extras, como por exemplo limitar o suporte e proteger invólucros (Liu et al., 2018).

2.1.1.1 Hidrogel

Hidrogel é considerado como a base da impressão celular. É composto por redes de polímeros 3D constituídos por hidrossóis ricos em água (Lei & Wang, 2016). Os hidrogéis farmacêuticos são classificados de acordo com a via de administração, o tipo de fármaco, farmacocinética, etc. (Malda et al., 2013). São projetados para imitar o ambiente extracelular dos tecidos do corpo, podendo absorver milhares de vezes o seu peso seco em água (De Beer et al., 2019; Worthington et al., 2017).

Os hidrogéis são produzidos a partir de uma variada gama de elementos, como por exemplo colagénio, fibrina, alginato, entre outros. Têm capacidade de serem impressos isoladamente para semear células ou podem ser bioimpressos com células já suspensas na matriz de hidrogel. (Weems et al., 2020)

Esta categoria de *bioink* desempenha um papel fundamental no *bioprinting*. O hidrogel não só contacta diretamente com as células fornecendo suporte estrutural, como também define as propriedades físico-químicas da *bioink* (Mandrycky et al., 2016).

Com exceção dos tipos de tecidos mais rígidos, como osso e dentes, hidrogéis podem conceder características elásticas através da manipulação química, densidade da reticulação e concentração de polímeros, mimetizando o comportamento elástico da maioria dos tecidos moles do corpo (Gu et al., 2015).

Para manter a viabilidade celular e as interações célula-célula, alguns materiais de hidrogel podem ser adicionados à tinta. Hidrogéis também podem funcionar como substratos e estrutura (Saunders & Derby, 2014). Os hidrogéis têm propriedades químicas

e físicas especiais, e podem ser degradados *in vivo* algum tempo após o enxerto. (Gu et al., 2015)

Hidrogéis produzidos a partir de blocos de construção sintéticos ainda não promovem interações celulares, no entanto, essa limitação pode ser colmatada utilizando modelos que estimulem a adesão celular (Kolesky et al., 2018).

As características físicas e biológicas únicas dos hidrogéis, juntamente com a enorme diversidade, conduziram a que, estes, representassem um excelente candidato para os sistemas de veiculação de agentes terapêuticos (Malda et al., 2013).

2.1.2. Células

A célula é a unidade básica e fundamental de todo e qualquer organismo. É a base dos tecidos e dos órgãos, e para os replicar fielmente a uma escala macro, as células utilizadas no *bioprinting* devem ter a capacidade de proliferar. A seleção das células para a bioimpressão deve ter em consideração dois fatores essenciais: o poder de imitar o estado fisiológico das células *in vivo*, e a capacidade de manter e desenvolver funções *in vivo* em microambientes otimizados (Murphy & Atala, 2014).

Os tecidos fabricados são construídos por células primárias funcionais, em conjunto com células de suporte (H. Cui et al., 2017; X. Zhang & Zhang, 2015) ou células-tronco para maior diferenciação (Duarte Campos et al., 2013; F. Xu et al., 2011).

Nem todos os tipos de células têm capacidade de se regenerar após dano (por exemplo, células do músculo cardíaco), no entanto, as células estaminais têm a capacidade de proliferar e diferenciar nos tipos de células desejadas, tornando-se, portanto, a fonte celular mais promissora (Guillemot, Mironov, & Nakamura, 2010; Ozbolat, 2015).

A impressão direta de células estaminais aumenta rapidamente a complexidade do *bioprinting*, uma vez que vários tipos de células incorporadas dentro do mesmo hidrogel precisam de ser impressas em paralelo (Bishop et al., 2017). O alinhamento em tempo real e o controle das etapas de impressão utilizando várias *bioink* celulares apresenta maior risco de introduzir um erro no processo de impressão, devido ao maior número de trocas entre tintas/células (Mandrycky, Wang, Kim, & Kim, 2016a). A impressão com células estaminais reduz o número total de *bioink* em cada processo e, conseqüentemente, o risco de erro. Por sua vez, a utilização de células estaminais no *bioprinting* adiciona o seu próprio conjunto de complicações. Para tentar colmatar estas complicações, há a

necessidade de adicionar fatores de crescimento e pequenas moléculas sinalizadoras para orientar a diferenciação específica do tecido alvo e em diferentes estádios de maturação. A escolha da origem das células-tronco, modelo de *bioprinting*, seleção da estrutura suporte, aditivos e forças mecânicas aplicadas pode influenciar a diferenciação de células estaminais em direção a um tecido alvo específico (Irvine & Venkatraman, 2016). Sem este tipo de abordagem a cultura pós-impressão torna-se mais difícil, especialmente quando a vascularização é desejada (Mandrycky et al., 2016).

Os três tipos de células estaminais mais utilizadas no *bioprinting 3D* são embrionárias, mesenquimais e pluripotentes, que variam na sua potência celular, ou seja, a capacidade de se diferenciar, na capacidade de gerar imunotolerância e na sua acessibilidade (Yamanaka, 2012; Gao et al., 2016).

Um dos benefícios de utilização de células estaminais no *bioprinting* é a capacidade que estas têm de induzir tolerância imune e expandir-se uma vez incorporadas no tecido alvo (Irvine & Venkatraman, 2016).

As *bioinks* de células são produzidas em formas e tamanhos variados, com complexidade geométrica, de modo a gerar construções multifacetadas de tecido mimético 3D. (Guillemot et al., 2010; Ozbolat, 2015) Esta característica camaleônica das células estaminais sustenta a tese de que são uma mais-valia na impressão de órgãos e tecidos para criar tecidos 3D novos e funcionais.

3. Bioprinting 3D na Área Farmacêutica

Os tecidos e órgãos humanos são compósitos imensamente complexos, compostos por matriz extracelular, células e uma vasculatura rica que remove resíduos e fornece os nutrientes de suporte à sua função (Stock & Vacanti, 2001).

O *bioprinting* 3D possui uma vasta aplicabilidade em diversas áreas, como a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, transplantes, investigação no âmbito da oncologia e desenvolvimento de medicamentos (Peng, Unutmaz, & Ozbolat, 2016).

Na última década, a utilização de modelos 3D *in vitro* aumentou significativamente, como resultado do desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliam e/ou substituem o uso de animais na experimentação científica (Kim, Lee, & Suh, 2008). Tornou-se, portanto, perentório explorar, na sua plenitude, a importância das células cultivadas nos modelos 3D (Eglen & Randle, 2015).

Recentemente, houve um enorme progresso na bioengenharia de tecidos e órgãos no âmbito do desenvolvimento de novos modelos 3D, aplicando-os em ensaios pré-clínicos, estudos toxicológicos e como modelos representativos da fisiologia humana (Pati et al., 2016). Embora para diferentes finalidades, a tecnologia *bioprinting 3D* tem sido utilizada no fabrico de uma grande variedade de tecidos e órgãos, entre os quais osso, cérebro, tecido cancerígeno, tecido cardíaco, cartilagem, fígado, rim, pulmão, pele, redes vasculares, etc. (Ozbolat, Peng & Ozbolat, 2016).

Em suma, a construção de modelos *in vitro* de tecido humano a três dimensões, que mimetizam os tecidos *in vivo*, permitiria o desenvolvimento de medicamentos (Clotworthy, 2012), ensaios cosméticos (Adler et al., 2011), modelação de doenças e, eventualmente, reparação de tecidos e órgãos (Bishop et al., 2017).

3.1. Vantagens e Desvantagens da Técnica

No processo de bioimpressão, existem três características essenciais a ter em conta – Matriz Extracelular, células e vasculatura - enquanto é controlada com precisão a composição do tecido, a microarquitetura e a geometria (Kolesky et al., 2018), o que torna este, um processo com elevada exigência e minúcia. Contudo, apesar da minuciosidade exigida no processo de construção de tecidos e órgãos a três dimensões, o *Bioprinting 3D* consegue apresentar elevada precisão e exatidão, alta resolução na deposição de células e

tem a capacidade de realizar várias culturas celulares em simultâneo organizadas espacialmente e com baixo risco de contaminação cruzada (Peng et al., 2017).

Segundo Pati et al. (2016), o *Bioprinting 3D* apresenta vantagens como:

- Produção automatizada e reprodutível de construções teciduais;
- Criação de um microambiente específico para células;
- Construção de arquitetura específica do tecido;
- Avaliação de fármacos em modelos específicos;
- Incorporação de microfluidos com estrutura 3D;
- Construção de tecidos vascularizados;
- Viabilidade e funcionalidade celular;
- Possibilidade de construção de interfaces tecido-tecidos.

Existem, ainda, outros benefícios que podem ser alcançados com a utilização do *Bioprinting 3D*. A aplicação, a curto prazo, que mais beneficiaria desta tecnologia seria o desenvolvimento de fármacos (reduzindo, assim, a necessidade de modelos animais), uma vez que os ensaios pré-clínicos poderiam ser realizados nos órgãos 3D. A vantagem que a bioimpressão 3D oferece, é que permite reprogramar as próprias células de um indivíduo, usando-as para gerar organoides bioimpressos avaliando a potência e eficácia de um fármaco. Deste modo, o uso potencial em órgãos humanos representaria um método mais ético do que o uso de animais para ensaios farmacológicos, mais eficiente e confiável. Esta estratégia também permitiria mitigar a reação de determinados indivíduos a um medicamento através da análise da incidência de reações adversas e elevadas dosagens, podendo esta ser ajustada ao efeito terapêutico necessário (Vermeulen, Haddow, Seymour, Faulkner-Jones, & Shu, 2017).

Não obstante, tendo em conta a complexidade e especificidade dos nichos celulares 3D, a criação de construtos biomiméticos com simulação topológica e mecânica adequada ainda é um desafio significativo ao fabrico destes modelos tridimensionais (Peng et al., 2017). Além disso, devido à complexidade da configuração específica necessária ao fabrico dos órgãos, os modelos de cultura 3D podem não ser todos adequados para a realização de ensaios de fármacos rotineiros, pela indústria farmacêutica (Kostadinova et al., 2013; Messner, Agarkova, Moritz, & Kelm, 2013).

Atualmente, apenas alguns modelos humanos de cocultura 3D estão disponíveis para aplicação em ensaios farmacológicos (Khetani et al., 2013). Embora tenham havido muitos avanços na descoberta e desenvolvimento de fármacos nos últimos anos, para além dos já referidos, ainda existem vários desafios que inibem o desenvolvimento farmacêutico, como por exemplo, o elevado custo e tempos de ciclo longos (H. Cui et al., 2018).

Apesar dos seus benefícios, os modelos 3D ainda acarretam algumas limitações (Eglen & Randle, 2015). Uma das principais limitações surge com a incorporação de múltiplos tipos de células, resultando numa maior heterogenia e variabilidade de dados. Em segundo lugar, algumas matrizes extracelulares naturalmente derivadas apresentam variações significativas de propriedades biológicas, entre diferentes lotes, originando resultados experimentais inconsistentes (Eglen & Randle, 2015). Embora as matrizes sintéticas apresentem desempenhos mais consistentes, a baixa biocompatibilidade limita a sua utilização (Hoque, Chuan, & Pashby, 2012).

As limitações do *bioprinting* mais importantes estão associadas à necessidade de uma rede vascular para manter a viabilidade celular dentro do tecido bioimpresso ou órgão (Gu et al., 2015), a complexidade dos tecidos nativos (Vukicevic, Mosadegh, Min, & Little, 2017), a viscosidade do material (Y. S. Zhang et al., 2017), e, finalmente, as *bioink* disponíveis no mercado. Uma *bioink* ideal deve ser fortemente biocompatível, com parâmetros reológicos apropriados, integridade arquitetónica e garantir um equilíbrio entre viabilidade celular e funcionalidade após a bioimpressão (Chung et al., 2013).

Todavia, dentro das referidas, a principal limitação da cultura 3D é a fraca vascularização, que desempenha um papel proeminente na determinação do comportamento celular devido ao transporte limitado de oxigénio, nutrientes, fármacos e fatores intercelulares ao longo da estrutura 3D (Villasante & Vunjak-Novakovic, 2015). Finalmente, os modelos funcionais de tecido 3D não têm a capacidade de formar arquiteturas hierárquicas e ordenadas, e estruturas que recapitem a organização de tecidos nativos a partir de células cultivadas *in vitro*. (Asthana & Kisaalita, 2013). Para superar as deficiências dos modelos 3D, essas comunicações celulares devem ser estabelecidas de forma biomimética, proporcionando às células humanas o nicho específico, fornecendo características topológicas adequadas e estimulando tensões mecânicas como *in vivo*. Entre vários métodos desenvolvidos para projetar sistemas de cultura 3D, a bioimpressão oferece grande potencial para imitar as comunicações *in vivo* célula-célula e célula-matriz (Peng et al., 2016).

Em suma, os ensaios de toxicidade e eficácia *in vitro* são desafiadores e têm dificuldade em prever com precisão os resultados *in vivo*, pois ainda não conseguem mimetizar, com precisão, condições fisiológicas *in vivo* de sistemas de órgãos complexos, não fornecendo, portanto, resultados realistas (H. Cui et al., 2018).

3.2 Descoberta e Desenvolvimento de Fármacos

Embora construções de tecidos 3D bioimpressos tenham várias vantagens e ensaios exploratórios tenham mostrado resultados encorajadores para testes farmacêuticos, as aplicações de pesquisa industrial de bioimpressão 3D no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos devem ser ponderadas (Ozbolat et al., 2016).

Matrizes 3D com microarquiteturas bem definidas e distribuição celular semelhante a tecidos permitiria excelentes interações célula-célula e célula-MEC, (Pampaloni, Reynaud, & Stelzer, 2007; Peng et al., 2017) e, conseqüentemente, mostrar uma resposta semelhante aos compostos medicamentosos como tecidos nativos.

Os avanços na impressão 3D permitiram, até ao momento, a produção direta e rápida de estruturas que imitam morfologia e algumas características específicas do tecido. Uma vez construído, o tecido bioimpresso partilha muitas características com o tecido nativo, incluindo densidade celular semelhante ao tecido, presença de múltiplos tipos de células e aspetos arquitetónicos e funcionais chave. Assim, os tecidos bioimpressos 3D podem ajudar a acelerar o processo de descoberta de medicamentos, permitindo o teste de novos e promissores fármacos em tecidos humanos funcionais e de otimização do medicamento em desenvolvimento (Pati et al., 2016).

Vários tecidos bioimpressos com diferentes células, MEC e arquiteturas foram construídos para explorar o potencial para atuar como modelos *in vitro* em ensaios de eficácia, toxicidade, quimioterapia ou quimiorresistência. No entanto, apenas algumas construções foram implementadas comercialmente para testar a eficácia e a toxicidade dos fármacos. Um modelo farmacológico *in vitro* ideal para ensaios de fármacos deve combinar arquitetura biomimética com aspetos finais mensuráveis para quantificar a eficácia do fármaco. (Peng et al., 2017)

3.2.1 Veiculação de fármacos

A veiculação de fármacos pressupõe a utilização de dispositivos ou meios que auxiliem um fármaco a atingir o alvo terapêutico.

O *Bioprinting* 3D por ser altamente controlado, desde a bioimpressão de camada de suporte (andaimes) à deposição controlada no tempo e no espaço da *bioink* e ao tamanho dos órgãos impressos, e tem a capacidade de auxiliar na veiculação controlada de medicamentos. O *bioprinting* a jato ou por gotículas é útil em estudos que envolvem a administração de medicamentos em determinada concentração de gradientes (E. D. Miller et al., 2011). Da mesma forma, para a veiculação de elementos genéticos, como ADN, ou oligonucleótidos, a bioimpressão a jato térmica é preferível, dado que garante alta eficiência na transferência genética, formando poros transitórios na membrana, sem causar danos celulares significativos (Owczarczak, Shuford, Wood, Deitch, & Dean, 2012).

O processo de impressão a jato térmico interrompe temporariamente as membranas celulares criando poros transitórios, que permitem a entrada de plasmídeos de ADN. Esta técnica é relativamente inócua dado que os poros fecham a tempo de manter a viabilidade celular. Os poros são formados pelo stress provocado pelo calor na membrana, causando uma microdisrupção temporária, permitindo que células e plasmídeos genéticos passem pelos canais durante o processo de bioimpressão. Os plasmídeos são assim transferidos para as células e, posteriormente, gotículas contendo células geneticamente modificadas são veiculadas a locais-alvo dentro de uma matriz 3D (Chang, Nam, & Sun, 2008; X. Cui, Dean, Ruggeri, & Boland, 2010; Owczarczak et al., 2012).

3.2.2. Seleção do Alvo Terapêutico

No processo de *bioprinting 3D*, o primeiro passo na escolha do órgão ou conjuntos de órgãos a imprimir é a seleção do alvo(s) terapêutico(s); o segundo passo é estabelecer a viabilidade do modelo 3D o mais precocemente possível no ciclo de desenvolvimento. Esta etapa também requer um alvo medicamentoso essencial cuja associação com a doença pode ser validada, por exemplo, por biomarcadores, particularmente úteis no estudo de doenças do sistema nervoso central ou oncologia (Satpathy et al., 2018a).

Atualmente, a identificação e validação do alvo terapêutico e, posterior seleção é baseada em evidências genéticas de indivíduos com alterações a nível de ganho ou perda

de função, bem como efeitos biológicos observados após modulação farmacológica em modelos animais.

A modulação farmacológica de alvos em modelos animais, frequentemente gera efeitos que diferem das respostas humanas devido à variabilidade entre as espécies. Experiências comuns *in vitro* utilizando linhas de células humanas também não recapitulam a resposta *in vivo* (Monie & Bhatia, 2015), daí a necessidade de introduzir o *Bioprinting 3D* neste gênero de estudos.

O *Bioprinting 3D* tem a capacidade de mimetizar estados fisiológicos com complexidades nativas e relevância clínica, o que pode auxiliar na identificação e validação dos potenciais alvos terapêuticos, juntamente com o seu mecanismo de ação, bem como o estudo da correlação de alvos com biomarcadores (Hong, Lee, Hwang, Shin, & Park, 2016).

3.2.3. Avaliação da Eficácia

O *Bioprinting 3D* pode ser utilizado no fabrico de modelos de tecidos e órgãos 3D com o objetivo de realizar ensaios de eficácia *in vitro* na fase “*hit-to-lead*”, ou como complemento ou alternativa na otimização *in vivo* do fármaco com maior potencial. Linhas celulares de origem humana, células-tronco ou células primárias podem ser utilizadas em ensaios de eficácia, juntamente com uma matriz extracelular ajustada para mimetizar condições *in vivo*. Contudo, são necessários tecidos fisiológicos bioimpressos ou modelos com patologia com relativa estabilidade para obter dados repetitivos e robustos (Peng et al., 2017).

O objetivo quando se constrói um modelo de estudo de eficácia bem-sucedido é criar um modelo que expresse as principais características de determinada doença. Por exemplo, os modelos de quimioterapia são de preferência criados pela bioimpressão, uma vez que as interações célula-célula e célula-MEC desempenham papéis importantes no desenvolvimento do tumor e metástase. Até ao momento, foram bioimpressos modelos complexos de cocultura para investigar angiogénese e respostas imunológicas locais, o que essencialmente melhora a previsão de propriedades quimioterapêuticas dos compostos em teste (Y. S. Zhang et al., 2016).

Atualmente, com exceção de alguns modelos tumorais com monotipos celulares ou células heterogêneas impregnadas em camadas estruturais (Zhao et al., 2014), relatos de bioimpressão de outros modelos de doença são raros. Por outro lado, para a fase de otimização do composto líder, os construtos surgem como complemento extremamente econômico e altamente eficiente, comparando com os modelos clássicos da doença *in vivo*. As principais vantagens incluem a redução dos custos associados aos animais e compostos, a eliminação de preocupações éticas decorrentes do uso animal, tempos mais curtos necessários para propriedades de expressão de doenças, que não são fielmente replicadas pelos modelos animais e menor variação de dados. De momento, ainda é necessário obter aprovações regulamentares relevantes para modelos *in vitro* 3D serem utilizados como substitutos de modelos *in vivo* animais e um grande número de estudos exploratórios e confirmatórios ainda devem ser realizados (Monie & Bhatia, 2015).

3.2.4. Análise da Toxicidade

A maior limitação dos modelos atuais quanto aos ensaios retrospectivos de toxicidade *in vitro* na segurança dos fármacos é, principalmente, que o curto tempo de cultura de sistemas simples de culturas celulares monocamada, não reflete com precisão a complexa fisiologia de um órgão-alvo (Messner et al., 2013). A falta de sistemas *in vitro* que identifiquem eficientemente a toxicidade dos órgãos ainda constitui um dilema na indústria farmacêutica. É de conhecimento comum que a causa mais frequente para a rejeição de fármacos é a toxicidade hepática. No entanto, a maioria dos estudos publicados utiliza culturas de monocamadas e monotipos de linhas celulares transformadas como hepatócitos primários como substitutos hepáticos em ensaios *in vitro* de hepatotoxicidade (Yoon No & Lee, 2015).

Inicialmente, eram realizados ensaios básicos de toxicidade *in vitro* de potenciais moléculas, bem como ensaios quanto à segurança, à medida que se avançava do processo de descoberta para o desenvolvimento de medicamentos. Contudo, a elevada percentagem de vieses pré-clínicos e clínicos enfatizou a necessidade da aplicação precoce de avaliações toxicológicas. A realização precoce de ensaios toxicológicos englobava tanto os ensaios *in vitro* preditivos como retrospectivos (King et al., 2013), realizados em modelos monocamada (modelos a duas dimensões). Estes ensaios *in vitro* em modelos monocamada envolveram um grande investimento por parte da indústria farmacêutica, no entanto continuaram a obter uma elevada taxa de falha toxicológica pré-clínica,

permanecendo ainda um desafio prever a toxicidade *in vitro* em modelos pouco complexos permanece ainda um desafio (Waring et al., 2015).

A lesão hepática induzida por fármacos, incluindo toxicidade idiossincrática e hepatocarcinogênese, são mediadas por interação entre os diferentes tipos de células que residem no fígado; assim, a toxicidade hepática precisa não pode ser prevista usando a cultura de células monocamada (Kostadinova et al., 2013)

A melhoria das previsões de toxicidade de medicamentos com base em dados *in vitro* não depende apenas do sistema e de melhores leituras, mas também dos modelos utilizados para gerar esses dados. Houve então a necessidade de recorrer a modelos 3D *in vitro*, que revelaram maior biomimetria toxicológica em fármacos do que os modelos 2D tradicionais (Skardal, Devarasetty, Soker, & Hall, 2015).

Embora nem todos os ensaios de toxicidade *in vitro* tenham necessidade de modelos 3D para melhorar a previsibilidade, o rastreamento toxicológico *in vitro* prematuro melhora significativamente a capacidade de filtrar e rejeitar precocemente compostos com elevada toxicidade (King et al., 2013).

Após a identificação dos órgãos-alvo e a margem de segurança através de ensaios *in vivo*, os ensaios retrospectivos específicos de toxicidade *in vitro* do órgão-alvo são importantes para a otimização do fármaco com maior potencial. Ao contrário dos modelos preditivos de ensaio de toxicidade *in vitro*, o modelo retrospectivo de ensaio de toxicidade *in vitro* requer um maior grau de traços biomiméticos, ou seja, maior semelhança aos órgãos nativos (Peng et al., 2017).

Atualmente, estão disponíveis alguns sistemas humanos de cocultura 3D de substitutos hepáticos, com o objetivo de serem utilizados em ensaios de segurança de fármacos e todos mostram melhor previsibilidade do que os sistemas de monocamadas 2D (Skardal et al., 2015). Até ao momento já foram desenvolvidos modelos 3D do coração, rins e pele, os principais órgãos alvo de efeitos colaterais induzidos por fármacos (Astashkina, Mann, & Grainger, 2012). Além da relevância biológica validada, a configuração técnica dos modelos 3D precisa de ser compatível com testes de nível industrial, incorporando automatização, facilidade de utilização e reprodutibilidade dos modelos. Até ao momento, os modelos 3D bioimpressos têm a capacidade de enfrentar estes desafios e, portanto, devem ser utilizados em ensaios retrospectivos de toxicidade *in vitro* de compostos (Nguyen et al., 2016; Vaidya, 2015).

3.2.5. Ensaios de Alto Rendimento

Ensaios de Alto Rendimento são processos automatizados que visam avaliar rapidamente a atividade biológica ou bioquímica de amostras de grande dimensão de compostos durante o processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos.

No processo de descoberta de fármacos, ensaios de alto rendimento são utilizados na seleção de um elevado número de compostos. Esta seleção é realizada com recurso à vinculação de enzimas, recetores e canais de iões com base em atividades potenciais e funcionais, que se unem ao alvo molecular desejado. (Peng et al., 2017). O *Bioprinting 3D* vem trazer uma inovação aos ensaios de alto rendimento, auxiliando nas triagens paralelas para estudos de eficácia e toxicidade numa microplataforma de suporte, como por exemplo um microtecido ou micromatriz celular dentro de micropoços de placas. Ensaios de Alto Rendimento têm a capacidade de realizar vários ensaios em simultâneo para diferentes alvos, compostos e doses, sem contaminação cruzada, e requer apenas uma pequena quantidade de fármaco. A limitação deste tipo de ensaio surge quando há a necessidade de recriar o ambiente *in vivo* e recapitular reações *in vivo*. Ensaios de alto rendimento apresentam baixa fidelidade na recriação de microambientes, resultando no descontrolo do processo de desenvolvimento. Atualmente os microensaios mais comuns em plataformas de ensaios de alto rendimento são os sistemas de cultura celular 2D, no entanto espera-se que estes sejam substituídos por microensaios 3D por apresentarem maior fidelidade (Gidrol et al., 2009).

Um modelo avançado de pulmão 3D foi projetado através da bioimpressão, para ser utilizado em ensaio de alto rendimento para avaliação de segurança e testes de eficácia (Golbamaki & Benfenati, 2016). O principal componente da bioimpressora foi a unidade de processo composta por três secções de trabalho e equipada com cabeças de impressão que permitiam a impressão simultânea de até três biomateriais ou células diferentes. O método de bioimpressão permitiu uma construção automatizada e reprodutível, criando camadas celulares finas e homogêneas essenciais para uma barreira de tecido ar-sangue, ideal para a aplicação pretendida (Alqahtani, 2017).

Com o intuito de avaliar os efeitos crónicos de diferentes fármacos através de alto rendimento, cada unidade num microórgão 3D deve estar ligada a um fluxo independente no biorreator. Na descoberta de medicamentos, ensaio de alto rendimento juntamente com microensaios 3D bioimpressos podem ser utilizados para analisar a eficácia e a toxicidade *in vitro*. Para acelerar a autenticação ou otimização do potencial fármaco, o ensaio de alto rendimento pode ser usado em ensaios de eficácia *in vitro* com triagem de fenótipo

funcional baseado em células. Estes microensaios com modelos 3D em conjunto com os de alto rendimento devem ser realizados o mais cedo possível no processo, de modo a selecionar o fármaco com maior potencial mais cedo.

3.2.6 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME)

A farmacocinética inclui as etapas de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) e excreção (E), englobando todo o processo de veiculação de fármacos administrados e metabolitos. As propriedades ADME dos fármacos devem ser analisadas no período de descoberta pré-clínica. Embora os ensaios *in vivo* ADME ainda sejam realizados em animais, modelos biomiméticos *in vitro* para ensaios ADME são úteis para promover a procura de substâncias terapêuticas, especialmente explorando o papel dos metabolitos na eficácia ou toxicidade dos fármacos (Chang, Emami, Wu, & Sun, 2010).

Durante o processo de descoberta de medicamentos, devem estar disponíveis dados precisos sobre propriedades ADME que auxiliam na seleção dos candidatos com potencial. Propriedades ADME fracas, como má absorção, baixa biodisponibilidade e metabolismo de primeira passagem elevado, contribuem para o fracasso de muitos candidatos a medicamentos nas fases iniciais do processo de desenvolvimento (Kaitin, 2008).

A avaliação precoce da farmacocinética diminui consideravelmente a probabilidade de falha dos compostos em ensaios clínicos (Ghosh, Lawless, Waldman, Gombar, & Fraczkiwicz, 2016), pois não só ajuda na seleção de bons candidatos a medicamentos, como também fornece informação essencial para formas de dosagem adequadas e formulação (Alqahtani, 2017). Na prática, os vieses obtidos a partir de perfis farmacocinéticos deficientes aparentam ter diminuído nos últimos anos devido, em parte, à melhor caracterização pré-clínica da farmacocinética e mecanismo de ação do fármaco (Paul et al., 2010).

A previsibilidade dos parâmetros farmacocinéticos em humanos pode ser melhorada pela utilização de modelos *in vitro* produzidos através de células humanas (Waring et al., 2015). Para isso, é essencial que os modelos *in vitro* mimetizem o comportamento farmacocinético do metabolismo humano perante um fármaco, quando integrados em ensaios de segurança, eficácia e toxicidade. Assim, a bioimpressão 3D de diferentes células relacionadas com o metabolismo de células nativas conseguiria prever eficientemente a farmacocinética nos órgãos-alvo. (Peng et al., 2017)

4. Aplicações em Farmacotoxicologia: Órgãos 3D

De modo a prever a segurança de determinados fármacos em humanos, a próxima geração de sistemas *in vitro* precisa de replicar com maior semelhança a estrutura 3D, bem como o processo completo da função tecidual. Além disso, é necessário que os modelos 3D sejam favoráveis às mesmas leituras fenotípicas complexas que atualmente são utilizadas *in vivo*, incluindo análises bioquímicas e histologia (Nguyen et al., 2017).

Toxicocinética é a fase que indica acerca da cinética no organismo de substâncias tóxicas e metabolitos resultantes. Enquanto a toxicocinética é uma parte intrínseca de um estudo *in vivo* animal, ao desenvolver uma abordagem alternativa com base em estudos *in vitro*, a toxicocinética torna-se um primeiro passo absolutamente crucial e indispensável na tradução das observações *in vitro* para a situação humana *in vivo*. (Adler et al., 2011)

Os órgãos sólidos mais afetados pela toxicidade sistémica são o fígado e o rim, enquanto a pele também é um alvo chave de toxicidade tópica após a exposição química (Nguyen et al., 2017).

4.1. Fígado

O fígado, o maior órgão interno do corpo, realiza inúmeras funções, incluindo metabolismo, desintoxicação, homeostase, síntese proteica e produção de bÍlis (Kashte, Maras, & Kadam, 2018).

A lesão hepática induzida por fármacos ainda é a principal causa de insuficiência hepática aguda e de medicamentos retirados do mercado (Kaplowitz, 2005). Estudos em modelos animais pré-clínicos não conseguem prever na sua totalidade a toxicidade dos fármacos em humanos devido a variações específicas das espécies entre funções hepatocelulares humanas e animais (Pritchard et al., 2003). Modelos hepáticos humanos *in vitro* utilizados atualmente para prever a toxicidade induzida por fármacos incluem microsomas, linhas celulares, secções hepáticas e hepatócitos primários (Hewitt et al., 2007). Microsomas são usados em ensaios de alto rendimento para avaliar enzimas metabolizadoras de fármacos, mas não possuem suporte celular (Kostadinova et al., 2013).

Uma vez que o fígado desempenha o papel principal na biotransformação de fármacos, e é um importante órgão-alvo na toxicidade por eles induzida, a maioria dos sistemas *in vitro* incorpora células hepáticas ou tecidos. (Van Midwoud, Verpoorte, & Groothuis, 2011)

Considerando o papel central que o fígado apresenta no processamento xenobiótico e arquitetura estruturada de tecidos, não é surpresa que o fígado seja um foco do *Bioprinting* para aplicações toxicológicas (Nguyen et al., 2017). A tecnologia de *bioprinting* tem sido usada para fabricar tecidos hepáticos que retiveram os metabolismos de fármacos, glicose e lipídios. O tecido hepático bioimpresso exibiu expressão de transportadores de fármacos hepáticos e enzimas metabólicas durante várias semanas (Kizawa, Nagao, Shimamura, Zhang, & Torii, 2017).

Foi possível, até ao momento, investigadores criarem um tecido hepático compartimentado, composto por hepatócitos humanos primários, células estelares hepáticas e células endoteliais usando uma plataforma de *bioprinting* (Nguyen et al., 2016). As células progenitoras mantiveram a capacidade de formar células hepáticas produtoras de albumina após serem bioimpressas, sugerindo que o processo de construção não afetou processos de diferenciação. Considerando evidências recentes que mostram que coculturas de tecido *in vitro* 3D podem melhorar a formação de hepatócitos diferenciados mais maduros (Takayama et al., 2013), tecidos hepáticos bioimpressos podem finalmente auxiliar em ensaios farmacotoxicológicos (X. Ma et al., 2016).

4.2 Rim

Os rins desempenham um papel primordial no metabolismo e na eliminação de uma variedade de fármacos, com o túbulo proximal sendo exposto a altas concentrações de metabolitos hidrofílicos reativos, tanto na superfície luminal, após a filtração do plasma no glomérulo, como na superfície basolateral, após a absorção nos capilares peritubulares. Devido à ação de transportadores xenobióticos renais, expressos no epitélio, os compostos farmacêuticos podem acumular-se e concentrar-se no túbulo proximal (King et al., 2017).

Modelos *in vitro* de tecido renal assumem-se importantes na descoberta e desenvolvimento de medicamentos, tendo em conta que a nefrotoxicidade é uma preocupação significativa relativamente a muitos fármacos. Dados de desenvolvimento

de fármacos mostram que a nefrotoxicidade está associada a uma taxa de falha de 2% dos fármacos na fase pré-clínica e provocam cerca de 20% dos vieses na fase clínica (Harrison, 2016).

Em virtude da exposição a altas concentrações de xenobióticos filtrados e da sua elevada função metabólica e de transporte, o segmento de túbulos proximais é o mais afetado pela toxicidade renal. O túbulo proximal do rim está associado à maioria das lesões induzidas por fármacos e tem recebido atenção para a construção de modelos 3D. A preservação dos processos de transporte, polaridade e recetores é importante para a padronização de modelos *in vitro*. Até ao momento, foi possível aplicar o modelo de *bioprinting* por extrusão para criar túbulos proximais num modelo *in vitro*. Após duas semanas num meio de cultura, observou-se o desenvolvimento de células renais primárias em estruturas glomerulares e tubulares (Figura 8) (Homan et al., 2016). A *bioink* utilizada para construir este modelo era composta por gelatina/fibrina, ácido hialurónico e glicerol. O modelo de perfusão 3D bioimpresso mostrou morfologia epitelial, bem como interrupção dose dependente na barreira epitelial com um tratamento com ciclosporina A, um fármaco conhecido pela sua nefrotoxicidade. (King et al., 2017). Para além da ciclosporina A, o modelo mostrou utilidade na análise de toxicidade, dose dependente, de fármacos como cisplatina e resazurina. (Satpathy et al., 2018a)

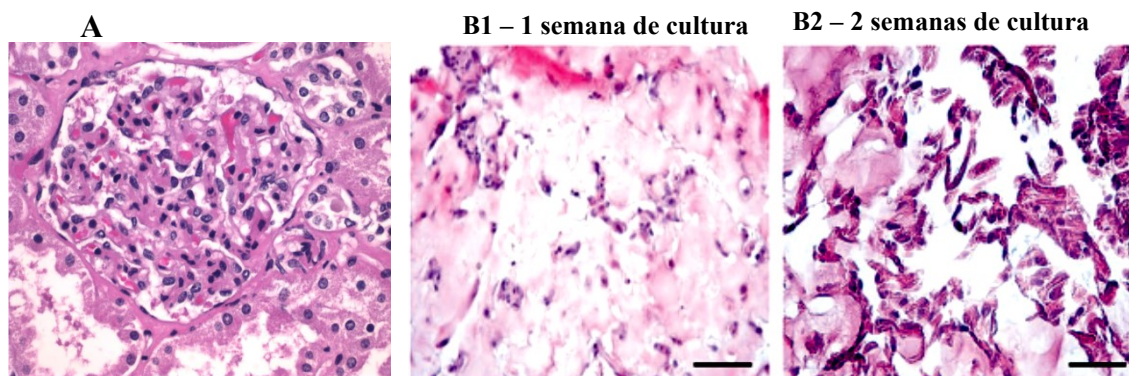


Figura 8 – (A) Corte Histológico de rim nativo; (B1) Corte Histológico de rim bioimpresso 1 semana em meio de cultura; (B2) Corte histológico de rim bioimpresso 2 semanas em meio de cultura. Barra de Escala: 50 μ m. Adaptado de Ali et al (2019)

4.3 Pele

A pele é o maior órgão do corpo, com uma estrutura complexa de várias camadas e que protege os músculos, ossos, ligamentos e órgãos internos subjacentes. Serve como

primeira linha de defesa para qualquer estímulo externo (Vijayavenkataraman et al., 2016). A sua estrutura com padrão laminar, composta pela epiderme, derme e hipoderme, é parte integrante da função-barreira para proteção, termorregulação, sensação, homeostase e imunidade (Tarassoli et al., 2018).

A produção de pele *in vitro* é um procedimento complexo e lento que nem sempre é uniforme. No entanto, a bioimpressão 3D vem alterar este panorama de produção lenta e desigual, permitindo a deposição cada vez mais controlada e precisa das células numa estrutura de tecido predefinida. Os principais passos na bioimpressão envolvem a escolha do modelo mais adequado de *bioprinting* e da estrutura tecidual, a seleção da *bioink*, a definição dos tipos e densidades celulares e, finalmente, a junção de todas estas etapas de modo a obter um tecido viável e funcional. (Vultur, Schanstra, & Herlyn, 2016)

Recentemente, foi utilizada a combinação do *bioprinting* a jato e o *bioprinting* por extrusão para recriar um modelo de espessura total e com arquitetura semelhante à pele nativa (Nguyen et al., 2017; Vijayavenkataraman et al., 2016). O modelo construído era formado por multicamadas compostas por fibroblastos, queratinócitos e um hidrogel à base de colagénio como componente estrutural (Satpathy et al., 2018a). Ambos os tipos de células mostraram manter a viabilidade e a proliferação, e produziram uma estrutura estratificada (Figura 9). A exposição de construções multicamadas bioimpressas à interface ar-líquido tem sido utilizada para promover o amadurecimento e estratificação do tecido, que é confirmado pela expressão de biomarcadores específicos da pele (Lee et al., 2014).

Os modelos de pele 3D provaram ser válidos tanto em termos de arquitetura quanto na sua aplicabilidade em testes de toxicidade na pele (Nguyen et al., 2017), através de microambientes que caracterizam o cancro de pele, estudando a proliferação celular, metástases e testes de fármacos quimioterapêuticos (Vultur et al., 2016).

Atualmente, as aplicações dermatológicas incluem modelos de pele 3D no teste de novos tratamentos biológicos para condições como psoríase, eczema (Lee et al., 2014), pele atópica e vitiligo (Supp & Boyce, 2005), bem como o estudo dos mecanismos de doenças de pele (Hou et al., 2017), substituindo modelos de pele animal. (Vultur et al., 2016)

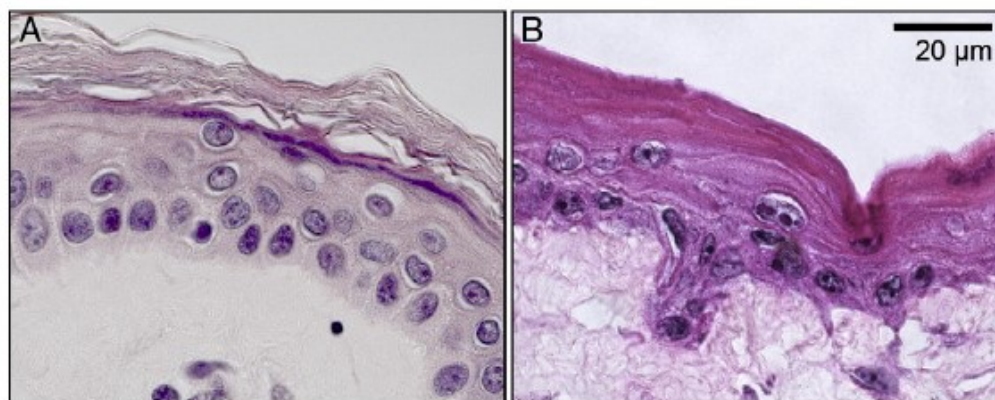


Figura 9 - Coloração histológica da pele in vivo (A) e estrato epidérmica/dérmica construída in vitro (B). Barra de escala é igual a 20 μ m. (Groeber, Holeiter, Hampel, Hinderer, & Schenke-Layland, 2011)

4.4 Intestino

A via oral é a via mais comum para a administração de medicamentos, e além da absorção e do metabolismo de primeira passagem, o intestino é alvo de toxicidade aparte do alvo terapêutico para compostos como antiinflamatórios não esteroides (Boelsterli, Redinbo, & Saitta, 2013), quimioterapia e, indiretamente, como local de interações medicamentosas (Bentz et al., 2013; Peters et al., 2016). Modelos animais são frequentemente utilizados para estimar a biodisponibilidade, no entanto, as diferenças entre espécies podem levar à disparidade na expressão de enzimas metabólicas e transportadores, resultando numa má previsão clínica (Peters et al., 2016)

Através do *bioprinting*, foi construído tecido intestinal tridimensional composto por enterócitos e miofibroblastos com arquitetura e função para modelar o intestino nativo. A análise histológica do tecido intestinal 3D demonstra um epitélio polarizado com junções apertadas e tipos especializados de células epiteliais e expressa enzimas CYP450 funcionais (Figura 10). (Madden et al., 2018). O modelo intestinal 3D revelou estabilidade na arquitetura e função tecidual superior a 2 semanas em cultura, sugerindo que o modelo pode ser adequado para estudos prospectivos de fármacos. (Peters et al., 2016) Os tecidos intestinais 3D desenvolveram função de barreira fisiológica, sendo possível distinguir entre compostos de alta e baixa permeabilidade. A caracterização bioquímica e histológica demonstrou que os tecidos intestinais 3D criaram lesões de resposta à toxicidade e inflamação induzidas por compostos (Figura 10 B,C), tornando o modelo compatível com ensaios pré-clínicos existentes e que pode ser implementado

como ponte adicional aos ensaios clínicos, aumentando a segurança e a eficácia no desenvolvimento de medicamentos (Madden et al., 2018). Esses dados combinados com a viabilidade a longo prazo sugerem que o modelo intestinal 3D pode ser aplicado para caracterizar outras classes conhecidas de fármacos com toxicidade conhecida fora do alvo terapêutico no intestino, como quimioterapia (Aprile, Rihawi, De Carlo, & Sonis, 2015), para avaliar vias inflamatórias e modelar doenças crônicas, como doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e colite ulcerosa (Aprile et al., 2015; Boelsterli et al., 2013)

A disponibilidade sistêmica, a eficácia reduzida e os efeitos fora do alvo continuam a ser desafios para uma previsão clínica bem-sucedida dos medicamentos candidatos e contribuindo para o aparecimento de vieses no processo e desenvolvimento de medicamentos, destacando a necessidade de melhores ferramentas pré-clínicas para modelar a função intestinal *in vitro* (Alqahtani, Mohamed, & Kaddoumi, 2013; Jones et al., 2016).

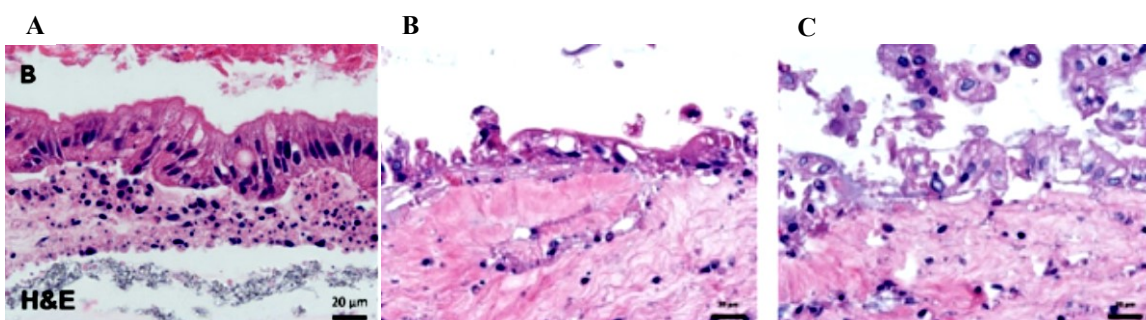


Figura 10 – (A) Corte Histológico do epitélio intestinal 3D; (B,C) Corte histológico epitélio intestinal 3D após exposição a doses tóxicas de indometacina (Madden et al., 2018)

4.5 Vascularização

As redes vasculares são componentes essenciais na distribuição de fármacos no organismo humano, tendo, por isso, um papel predominante na descoberta de medicamentos através de modelos 3D. (Datta, Ayan, & Ozbolat, 2017)

Até ao momento, o maior desafio para traduzir a bioimpressão em laboratório para construir tecidos funcionais envolve a bioimpressão de redes vasculares. Para manter as funções metabólicas, os tecidos ou órgãos nativos requerem a suplementação de nutrientes e oxigênio adequados, trocas gasosas e remoção de resíduos metabólicos, todos necessários para a maturação do tecido projetado (Kinstlinger & Miller, 2016) e para

manter a viabilidade e funcionalidade do órgão ou tecido. (Leijten et al., 2016) Sem rede vascular, os tecidos projetados não terão nutrientes suficientes, resultando na formação de um tecido incompleto ou necrose do mesmo. (Malda et al., 2013)

As construções vasculares através do *bioprinting* envolvem duas abordagens principais, que são o fabrico direto de construções ocas e a bioimpressão indireta com *bioinks* “fugitivas”, ou seja, facilmente removidas (J. Ma, Wang, & Liu, 2018). A bioimpressão indireta é realizada através da deposição de uma estrutura cilíndrica de *bioink* “fugitiva”, seguida da bioimpressão de hidrogel. (Ji & Guvendiren, 2017) A *bioink* utilizada na construção dos vasos *in situ*, visa manter a biocompatibilidade e estabilidade a longo prazo, e é constituída por células-tronco e MEC composta por uma mistura de gelatina e fibrinogénio (Kolesky et al., 2018).

Na construção de tecidos e órgãos tridimensionais biomiméticos na triagem de medicamentos e estudos biológicos, os vasos sanguíneos devem ser projetados integrando os construtos, de modo a mimetizar o processo de administração de medicamentos *in vivo* (Massa et al., 2017). A rede vascular deve estar presente numa fase precoce do desenvolvimento do tecido 3D de modo a prevenir a morte do tecido e permitir a fixação e crescimento do endotélio. À medida que o desenvolvimento se inicia, as estruturas vasculares devem assumir todas as funções que ocorrem no desenvolvimento *in vivo*, não só, as já referidas, função barreira seletiva de resíduos e nutrientes como também reações inflamatórias, coagulação e outras funções homeostáticas. (Michiels, 2003)

O uso da impressão 3D para desenvolver redes vasculares permite a produção de construções com canais permeáveis, locais de anastomose viáveis e controlo rigoroso sobre materiais matriciais, colocação celular e geometria vascular.

Embora as tecnologias de bioimpressão 3D não tenham atingido as capacidades de resolução ou manuseio de células necessárias para imprimir todas as pequenas e intrincadas redes, a tecnologia está a melhorar rapidamente. (Paulsen & Miller, 2015) A impressão 3D é um processo altamente adaptável que permite aos cientistas controlar cada elemento dentro do volume de construção, o que é incrivelmente valioso para o desenvolvimento de modelos *in vitro* consistentes para doenças vasculares ou ensaios de desenvolvimento de fármacos. (Paulsen & Miller, 2015)

5. Perspetivas futuras

A bioimpressão 3D de modelos de tecidos e órgãos é uma área de pesquisa vibrante na qual vários resultados pioneiros foram obtidos nos últimos anos. A gama de técnicas de bioimpressão 3D disponíveis tem o potencial de facilitar o desenvolvimento de modelos realistas de tecidos/órgãos. Investigadores têm aplicado a tecnologia de *bioprinting* a jato em terapias genéticas baseadas em células para mostrar que a transferência de genes para células é possível, juntamente com a entrega precisa de células modificadas para um determinado alvo, produzindo assim células geneticamente modificadas que se adaptam a determinada aplicação (T. Xu et al., 2009).

Nos próximos anos, espera-se que o *bioprinting* 3D avance para colmatar as necessidades de aplicações específicas, como modelos de triagem farmacêutica/toxicológica. A bioimpressão tem o potencial de revolucionar a forma como os fármacos são testados, bem como reduzir o custo e o tempo de descoberta de medicamentos, permitindo a identificação rápida de potenciais candidatos ou substâncias tóxicas aos tecidos humanos. A maioria dos resultados publicados foram nos estágios iniciais do desenvolvimento de tecidos/órgãos. Apenas alguns estudos investigaram minuciosamente os parâmetros do processo para derivar previsões ou estratégias de otimização de forma sistemática.(Pati et al., 2016)

Comparando perfis genómicos com amostras clínicas e testando a resposta a agentes terapêuticos com efeitos clínicos comprovados, será possível avaliar a capacidade de tradução *in vivo*, incluindo a capacidade de modelar o resultado da variação genética nos desfechos. Além disso, cada tecido isolado é apenas uma peça do quebra-cabeças. Encontrar estratégias para construir redes complexas de múltiplos tipos de tecidos e órgãos com vasculatura completa e permeável em meios de cultura controlados e que mimetizam com exatidão o meio *in vivo* constitui ainda um desafio.

Para a aplicação bem-sucedida de tecidos e órgãos como modelos *in vitro*, a padronização e otimização do processo de impressão em relação ao produto final são necessárias, além de cumprir com as boas práticas de fabrico (GMP). Por isso, há uma grande necessidade de estudos orientados para a compreensão das relações estruturais e do funcionamento dos parâmetros do processo dos construtos impressos. Além disso, os esquemas de fabrico modernos contam com modelagem matemática e simulações de computador para otimizar o design do processo e fazer previsões. (Catros et al., 2011) O desempenho e a função dos construtos teciduais podem ser previstos e, portanto,

melhorados, antes de imprimir usando simulações de computador. No entanto, essa abordagem precisa de mais atenção para ser específica na utilização de tecidos/órgãos 3D. As células-tronco têm um papel essencial na construção de tecido 3D porque oferecem grande potencial para a criação de construções complexas. (Marga et al., 2012) No entanto, existem vários problemas a ser resolvidos antes que as células-tronco possam ser realmente utilizadas no *bioprinting* 3D, como a otimização do microambiente celular, estimulação celular e estabilidade mecânica para imitar o ambiente *in vivo* num patamar mais realista. (Pati et al., 2016)

Embora a impressão 3D ainda esteja na sua infância dentro do setor farmacêutico, a transição para quatro dimensões (4D) pode ocorrer de antemão. A utilização de medicamentos altamente controlados, estudados com recurso aos órgãos tridimensionais, pode fornecer uma terapia mais direcionada e personalizada para as necessidades de cada indivíduo, iniciando uma revolução digital no fornecimento de medicamentos e cuidados de saúde.

O desenvolvimento de formas farmacêuticas complexas e o recurso a abordagens inovadoras no fabrico de órgãos 3D como meio de investigação são temas com o apoio da *Food and Drugs Administration*, pelo que a adoção de tecnologias tão inovadoras na área da saúde, como o *Bioprinting 3D*, pode estar para breve. Atualmente, as limitações técnicas e do controlo de qualidade são as restrições dominantes que dificultam a aplicação do *bioprinting* 3D. Espera-se que, uma vez estabelecida uma plataforma de impressão ideal, será uma questão de tempo até que as impressoras 3D sejam utilizadas pela indústria farmacêutica, iniciando uma nova era de saúde digital. (Trenfield et al., 2019)

O trabalho futuro deve focar-se em reter a complexidade do tecido, incorporando tipos de células adicionais, como células imunes ou células cancerígenas, e utilizando material saudável e doente de dadores (Fatehullah, Tan, & Barker, 2016; VanDussen et al., 2015). Esta complexidade permitirá uma melhor compreensão do impacto que cada tipo de célula terá no fenótipo de cada doença, bem como melhorar a caracterização dos candidatos para intervenção terapêutica e, ao mesmo tempo, replicar com maior pormenor os tamanhos de características finas de algumas estruturas teciduais, alcançar uma composição tecidual mais completa validando a aplicação destes sistemas nos ensaios de toxicologia e modelagem de doenças. (King et al., 2017)(Nguyen & Pentoney, 2017)

6. Conclusão

O *Bioprinting 3D* é uma tecnologia em constante evolução, que tem progredido significativamente ao longo dos anos, criando tecidos *in vitro* 3D que imitam com elevada proximidade a arquitetura e a função de tecido nativos. Embora as técnicas descritas ainda estejam numa fase precoce de desenvolvimento, oferecem grande potencial para superar muitos desafios associados à produção de tecidos e órgãos complexos, revelando-se ferramentas promissoras na progressiva substituição dos modelos utilizados nos ensaios atuais, muitas vezes enganosos, baseados em tecidos com complexidade medíocre ou modelos animais.

Até ao momento, estruturas 3D obtidas a partir do *bioprinting 3D* apenas são utilizados na triagem de medicamentos como um complemento aos processos padrão envolvidos na descoberta e desenvolvimento de medicamentos.

As limitações do *bioprinting* mais importantes estão associadas à necessidade de uma rede vascular complexa que consiga manter a viabilidade celular dentro do tecido/órgão bioimpresso, a complexidade dos tecidos nativos, a resolução de pequenos vasos e características finas dos tecidos, as *bioink* disponíveis no mercado. Todavia, dentro das referidas, a principal limitação da cultura 3D é a fraca vascularização, que desempenha um papel proeminente na determinação do comportamento celular devido ao transporte limitado de oxigénio, nutrientes, fármacos e fatores intercelulares ao longo da estrutura 3D.

Eficiência, reprodutibilidade e padronização são a base das limitações do *bioprinting 3D*. Ainda é necessário reproduzir sistemas tecidos/órgãos complexos eventualmente interligados, bem como modelos vasculares *in vitro* completos. Por este motivo, embora promissores, ainda é cedo para concluir que os modelos bioimpressos podem substituir modelos animais.

Desde o seu surgimento, o *bioprinting 3D* progrediu imenso em direção ao objetivo da impressão funcional de tecidos. Apesar dos desafios tem demonstrado claramente que a bioimpressão é digna de investigação. Mais tempo, esforço e experiência multidisciplinar vão ser necessários para cumprir o potencial clínico dessa tecnologia. A bioimpressão tem potencial para desempenhar um papel fundamental na medicina regenerativa personalizada e na Indústria Farmacêutica como alternativa aos modelos animais.

7. Bibliografia

Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van Benthem, J., Zuang, V., ... Zaldivar, J. M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: Current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology*, 85(5), 367–485. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0693-2>

Ali, M., Anil Kumar, P. R., Yoo, J. J., Zahran, F., Atala, A., & Lee, S. J. (2019). A Photo-Crosslinkable Kidney ECM-Derived Bioink Accelerates Renal Tissue Formation. *Advanced Healthcare Materials*, 8(7), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800992>

Alqahtani, S. (2017). In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 13(11), 1147–1158. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>

Alqahtani, S., Mohamed, L. A., & Kaddoumi, A. (2013). Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 9(10), 1241–1254. <https://doi.org/10.1517/17425255.2013.802772>

Amir-Aslani, A., & Mangematin, V. (2010). The future of drug discovery and development: Shifting emphasis towards personalized medicine. *Technological Forecasting and Social Change*, 77(2), 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2009.09.005>

Aprile, G., Rihawi, K., De Carlo, E., & Sonis, S. T. (2015). Treatment-related gastrointestinal toxicities and advanced colorectal or pancreatic cancer: A critical update. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11793–11803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11793>

Arslan-Yildiz, A., El Assal, R., Chen, P., Guven, S., Inci, F., & Demirci, U. (2016). Towards artificial tissue models: Past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8(1), 0. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/014103>

Leberfinger, A., J. Ravnic, D., Dhawan, A. (2017). Tissue Engineering and Regenerative Medicine *Concise Review: Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication*. 1940–1948.

Astashkina, A., Mann, B., & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*, *134*(1), 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.001>

Asthana, A., & Kisaalita, W. S. (2013). Biophysical microenvironment and 3D culture physiological relevance. *Drug Discovery Today*, *18*(11–12), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.12.005>

Bentz, J., O'Connor, M. P., Bednarczyk, D., Coleman, J., Lee, C., Palm, J., ... Ellens, H. (2013). Variability in P-Glycoprotein Inhibitory Potency (IC₅₀) Using Various in Vitro Experimental Systems: Implications for Universal Digoxin Drug- Drug Interaction Risk Assessment Decision Criteria. *Drug Metabolism and Disposition*, *41*(7), 1347–1366. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.050500>

Bioprinting, C., Case, T., Lobo, D. A., & Ginestra, P. (2019). *Cell Bioprinting: The 3D-Bioplotter™ Case*. 1–20.

Bishop, E. S., Mostafa, S., Pakvasa, M., Luu, H. H., Lee, M. J., Wolf, J. M., ... Reid, R. R. (2017). 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes and Diseases*, *4*(4), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.10.002>

Boelsterli, U. A., Redinbo, M. R., & Saitta, K. S. (2013). Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: Underlying mechanisms and novel strategies. *Toxicological Sciences*, *131*(2), 654–667. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs310>

Campbell, T., Williams, C., Ivanova, O., & Garrett, B. (2012). Strategic Foresight Report. *Atlantic Council*, 3–7.

Catros, S., Fricain, J. C., Guillotin, B., Pippenger, B., Bareille, R., Remy, M., ... Guillemot, F. (2011). Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication*, *3*(2). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/2/025001>

Causa, F., Sarracino, F., De Santis, R., Netti, P. A., Ambrosio, L., & Nicolais, L. (2006). Basic structural parameters for the design of composite structures as ligament augmentation devices. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, *4*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1177/228080000600400102>

Chang, R., Emami, K., Wu, H., & Sun, W. (2010). Biofabrication of a three-

dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model. *Biofabrication*, 2(4). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/4/045004>

Chang, R., Nam, J., & Sun, W. (2008). Direct cell writing of 3D microorgan for in vitro pharmacokinetic model. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 14(2), 157–166. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2007.0392>

Chimene, D., Lennox, K. K., Kaunas, R. R., & Gaharwar, A. K. (2016). Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(6), 2090–2102. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1638-y>

Chung, J. H. Y., Naficy, S., Yue, Z., Kapsa, R., Quigley, A., Moulton, S. E., & Wallace, G. G. (2013). Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science*, 1(7), 763–773. <https://doi.org/10.1039/c3bm00012e>

Clotworthy, M. (2012). The application of human tissue for drug discovery and development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(7), 543–547. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.689282>

Cui, H., Miao, S., Esworthy, T., Zhou, X., Lee, S. jun, Liu, C., ... Zhang, L. G. (2018). 3D bioprinting for cardiovascular regeneration and pharmacology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 252–269. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.014>

Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J. P., & Zhang, L. G. (2017). 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 6(1). <https://doi.org/10.1002/adhm.201601118>

Cui, X., Dean, D., Ruggeri, Z. M., & Boland, T. (2010). Cell damage evaluation of thermal inkjet printed chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(6), 963–969. <https://doi.org/10.1002/bit.22762>

Das, S., & Basu, B. (2019). An Overview of Hydrogel-Based Bioinks for 3D Bioprinting of Soft Tissues. *Journal of the Indian Institute of Science*, 99(3), 405–428. <https://doi.org/10.1007/s41745-019-00129-5>

Datta, P., Ayan, B., & Ozbolat, I. T. (2017). Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta Biomaterialia*, 51(January), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.035>

De Beer, M. P., Van Der Laan, H. L., Cole, M. A., Whelan, R. J., Burns, M. A., & Scott, T. F. (2019). Rapid, continuous additive manufacturing by volumetric

polymerization inhibition patterning. *Science Advances*, 5(1).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8723>

Derby, B. (2012). Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*, 338(6109), 921–926. <https://doi.org/10.1126/science.1226340>

Duarte Campos, D. F., Blaeser, A., Weber, M., Jäkel, J., Neuss, S., Jahn-Dechent, W., & Fischer, H. (2013). Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication*, 5(1).
<https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015003>

Eglen, R. M., & Randle, D. H. (2015). Drug Discovery Goes Three-Dimensional: Goodbye to Flat High-Throughput Screening? *Assay and Drug Development Technologies*, 13(5), 262–265. <https://doi.org/10.1089/adt.2015.647>

Fatehullah, A., Tan, S. H., & Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, 18(3), 246–254.
<https://doi.org/10.1038/ncb3312>

Gauvin, R., Chen, Y. C., Lee, J. W., Soman, P., Zorlutuna, P., Nichol, J. W., ... Khademhosseini, A. (2012). Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials*, 33(15), 3824–3834.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.048>

Ghosh, J., Lawless, M. S., Waldman, M., Gombar, V., & Fraczekiewicz, R. (2016). *Modeling ADME*. 1425, 63–83. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0>

Gidrol, X., Fouqué, B., Ghenim, L., Haguët, V., Picollet-D'ahan, N., & Schaack, B. (2009). 2D and 3D cell microarrays in pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.002>

Golbamaki, A., & Benfenati, E. (2016). *In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity*. 1425, 107–119. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0>

Gou, M., Qu, X., Zhu, W., Xiang, M., Yang, J., Zhang, K., ... Chen, S. (2014). Bio-inspired detoxification using 3d-printed hydrogel nanocomposites. *Nature Communications*, 5(May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4774>

Grabowski, H., Vernon, J., & DiMasi, J. A. (2002). Returns on research and development for 1990s new drug introductions. *PharmacoEconomics*, 20(SUPPL. 3), 11–29. <https://doi.org/10.2165/00019053-200220003-00002>

Griffith, L. G., & Naughton, G. (2002). Tissue engineering - Current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295(5557). <https://doi.org/10.1126/science.1069210>

Griffith, L. G., Wells, A., & Stolz, D. B. (2014). Engineering liver. *Hepatology*, 60(4), 1426–1434. <https://doi.org/10.1002/hep.27150>

Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., & Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4), 352–366. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.005>

Gu, Q., Hao, J., Lu, Y. J., Wang, L., Wallace, G. G., & Zhou, Q. (2015). Three-dimensional bio-printing. *Science China Life Sciences*, 58(5), 411–419. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4850-3>

Guillemot, F., Mironov, V., & Nakamura, M. (2010). Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication*, 2(1). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/1/010201>

Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: An overview. *Biomaterials Science*, 6(5), 915–946. <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>

Guvendiren, M., & Burdick, J. A. (2013). Engineering synthetic hydrogel microenvironments to instruct stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(5), 841–846. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.009>

Guvendiren, M., Molde, J., Soares, R. M. D., & Kohn, J. (2016). Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(10), 1679–1693. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00121>

Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638–1649. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>

Harrison, R. K. (2016). Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(12), 817–818. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.184>

Hewitt, N. J., Lechón, M. J. G., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., ... Hengstler, J. G. (2007). Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metabolism Reviews*, 39(1), 159–234. <https://doi.org/10.1080/03602530601093489>

Homan, K. A., Kolesky, D. B., Skylar-Scott, M. A., Herrmann, J., Obuobi, H., Moisan, A., & Lewis, J. A. (2016). Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34845>

Hong, S., Lee, J. Y., Hwang, C., Shin, J. H., & Park, Y. (2016). Inhibition of Rho-Associated Protein Kinase Increases the Angiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cell Aggregates via Paracrine Effects. *Tissue Engineering - Part A*, 22(3–4), 233–243. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0289>

Hoque, M. E., Chuan, Y. L., & Pashby, I. (2012). Extrusion based rapid prototyping technique: An advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers*, 97(2), 83–93. <https://doi.org/10.1002/bip.21701>

Hou, X., Liu, S., Wang, M., Wiraja, C., Huang, W., Chan, P., ... Xu, C. (2017). Layer-by-Layer 3D Constructs of Fibroblasts in Hydrogel for Examining Transdermal Penetration Capability of Nanoparticles. *SLAS Technology*, 22(4), 447–453. <https://doi.org/10.1177/2211068216655753>

Irvine, S. A., & Venkatraman, S. S. (2016). Bioprinting and differentiation of stem cells. *Molecules*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/molecules21091188>

Jamróz, W., Szafraniec, J., Kurek, M., & Jachowicz, R. (2018). 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. *Pharmaceutical Research*, 35(9). <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2454-x>

Jeon, O., & Alsberg, E. (2013). Photofunctionalization of alginate hydrogels to promote adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part A*, 19(11–12), 1424–1432. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0581>

Ji, S., & Guvendiren, M. (2017). Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*,

5(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00023>

Jones, C. R., Hatley, O. J. D., Ungell, A. L., Hilgendorf, C., Annie, S., & Rostami-Hodjegan, A. (2016). Gut wall metabolism. Application of pre-clinical models for the prediction of human drug absorption and first-pass elimination. *AAPS Journal*, *18*(3), 589–604. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9889-y>

Kaigler, D., Silva, E. A., & Mooney, D. J. (2013). Guided Bone Regeneration Using Injectable Vascular Endothelial Growth Factor Delivery Gel. *Journal of Periodontology*, *84*(2), 230–238. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110684>

Kaitin, K. I. (2008). Obstacles and opportunities in new drug development. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *83*(2), 210–212. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100462>

Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*(6), 489–499. <https://doi.org/10.1038/nrd1750>

Kashte, S., Maras, J. S., & Kadam, S. (2018). Bioinspired engineering for liver tissue regeneration and development of bioartificial liver: A review. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, *46*(5), 413–427. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2018028276>

Katja Hölzl, Shengmao Lin^{3,6, 7}, Liesbeth Tytgat^{4, 5}, Sandra Van Vlierberghe^{4, 5}, Linxia Gu³ and, & Aleksandr Ovsianikov^{1, 2}. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, *8*. Retrieved from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/8/3/032002/pdf>

Khalil, S., & Sun, W. (2007). Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs. *Materials Science and Engineering C*, *27*(3), 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.023>

Khetani, S. R., Kanchagar, C., Ukairo, O., Krzyzewski, S., Moore, A., Shi, J., ... Will, Y. (2013). Use of micropatterned cocultures to detect compounds that cause drug-induced liver injury in humans. *Toxicological Sciences*, *132*(1), 107–117. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs326>

Kim, S. M., Lee, S. H., & Suh, K. Y. (2008). Cell research with physically modified microfluidic channels: A review. *Lab on a Chip*, 8(7), 1015–1023. <https://doi.org/10.1039/b800835c>

King, S. M., Gorgen, V., Presnell, S. C., Nguyen, D. G., Shepherd, B. R., Ridge, N., & Diego, S. (2013). Development of 3D bioprinted human breast cancer for in vitro screening of therapeutics targeted against cancer progression. *Tissue Applications and Systems Engineering Groups*, 6275.

King, S. M., Higgins, J. W., Nino, C. R., Smith, T. R., Paffenroth, E. H., Fairbairn, C. E., ... Nguyen, D. G. (2017). 3D proximal tubule tissues recapitulate key aspects of renal physiology to enable nephrotoxicity testing. *Frontiers in Physiology*, 8(MAR), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00123>

Kinstlinger, I. S., & Miller, J. S. (2016). 3D-printed fluidic networks as vasculature for engineered tissue. *Lab on a Chip*, 16(11), 2025–2043. <https://doi.org/10.1039/c6lc00193a>

Kizawa, H., Nagao, E., Shimamura, M., Zhang, G., & Torii, H. (2017). Scaffold-free 3D bio-printed human liver tissue stably maintains metabolic functions useful for drug discovery. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.004>

Kolesky, D. B., Homan, K. A., Skylar-Scott, M., & Lewis, J. A. (2018). In Vitro human tissues via multi-material 3-D bioprinting. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 46(4), 209–215. <https://doi.org/10.1177/026119291804600404>

Kostadinova, R., Boess, F., Applegate, D., Suter, L., Weiser, T., Singer, T., ... Roth, A. (2013). A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.012>

Lee, V., Singh, G., Trasatti, J. P., Bjornsson, C., Xu, X., Tran, T. N., ... Karande, P. (2014). Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 20(6), 473–484. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0335>

Lei, M., & Wang, X. (2016). Biodegradable polymers and stem cells for bioprinting. *Molecules*, 21(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21050539>

Leijten, J., Rouwkema, J., Zhang, Y. S., Nasajpour, A., Dokmeci, M. R., & Khademhosseini, A. (2016). Advancing Tissue Engineering: A Tale of Nano-, Micro-, and Macroscale Integration. *Small*, *12*(16), 2130–2145. <https://doi.org/10.1002/sml.201501798>

Liu, F., Chen, Q., Liu, C., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., ... Wang, X. (2018). Natural polymers for organ 3D bioprinting. *Polymers*, *10*(11), 1–26. <https://doi.org/10.3390/polym10111278>

Lu, T., Li, Y., & Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, *8*, 337–350. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38635>

Ma, J., Wang, Y., & Liu, J. (2018). Bioprinting of 3D tissues/organs combined with microfluidics. *RSC Advances*, *8*(39), 21712–21727. <https://doi.org/10.1039/c8ra03022g>

Ma, X., Liu, J., Zhu, W., Tang, M., Lawrence, N., Yu, C., ... Chen, S. (2018). 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *132*, 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.011>

Ma, X., Qu, X., Zhu, W., Li, Y. S., Yuan, S., Zhang, H., ... Chen, S. (2016). Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(8), 2206–2211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524510113>

Madden, L. R., Theresa, V., Presnell, S. C., Deborah, G., Kelsey, N., Madden, L. R., ... Peier, A. (2018). Bioprinted 3D Primary Human Intestinal Tissues Model Aspects of Native Physiology and ADME / Tox Functions Bioprinted 3D Primary Human Intestinal Tissues Model Aspects of Native Physiology and ADME / Tox Functions. *ISCIENCE*, *2*, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.03.015>

Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., ... Hutmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, *25*(36), 5011–5028. <https://doi.org/10.1002/adma.201302042>

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34(4), 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>

Marga, F., Jakab, K., Khatiwala, C., Shepherd, B., Dorfman, S., Hubbard, B., ... Gabor, F. (2012). Toward engineering functional organ modules by additive manufacturing. *Biofabrication*, 4(2). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/4/2/022001>

Massa, S., Sakr, M. A., Seo, J., Bandaru, P., Arneri, A., Bersini, S., ... Zhang, Y. S. (2017). *Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis* *Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis*. 044109. <https://doi.org/10.1063/1.4994708>

Matai, I., Kaur, G., Seyedsalehi, A., McClinton, A., & Laurencin, C. T. (2020). Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, 226, 119536. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536>

Melchels, F. P. W., Domingos, M. A. N., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J., & Hutmacher, D. W. (2012). Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*, 37(8), 1079–1104. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007>

Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W., & Kelm, J. M. (2013). Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Archives of Toxicology*, 87(1), 209–213. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0968-2>

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), 430–443. <https://doi.org/10.1002/jcp.10333>

Miller, E. D., Li, K., Kanade, T., Weiss, L. E., Walker, L. M., & Campbell, P. G. (2011). Spatially directed guidance of stem cell population migration by immobilized patterns of growth factors. *Biomaterials*, 32(11), 2775–2785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.005>

Miller, E., Phillippi, J., Fisher, G., Campbell, P., Walker, L., & Weiss, L. (2009). Inkjet Printing of Growth Factor Concentration Gradients and Combinatorial Arrays Immobilized on Biologically-Relevant Substrates. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 12(6), 604–618. <https://doi.org/10.2174/138620709788681907>

Monie, D. D., & Bhatia, S. K. (2015). *Bioprinting of Dynamic Human Organ-on-Chips: Enabling Technologies for Rapid Drug Development and Personalized*

Medicine. 1–137. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-21386-6>

Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>

Musther, H., Olivares-Morales, A., Hatley, O. J. D., Liu, B., & Rostami Hodjegan, A. (2014). Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(1), 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.018>

Nguyen, D. G., Funk, J., Robbins, J. B., Crogan-Grundy, C., Presnell, S. C., Singer, T., & Roth, A. B. (2016). Bioprinted 3D primary liver tissues allow assessment of organ-level response to clinical drug induced toxicity in vitro. *PLoS ONE*, 11(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158674>

Nguyen, D. G., & Pentoney, S. L. (2017). Bioprinted three dimensional human tissues for toxicology and disease modeling. *Drug Discovery Today: Technologies*, 23(xx), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.001>

Nguyen, D. G., Pentoney, S. L., Jr, S. L. P., Lee, J. A., Biology, Q., Lilly, E., & Pentoney, S. L. (2017). Bioprinted three dimensional human tissues for toxicology and disease modeling. *Drug Discovery Today: Technologies*, 23(xx), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.001>

Owczarczak, A. B., Shuford, S. O., Wood, S. T., Deitch, S., & Dean, D. (2012). Creating transient cell membrane pores using a standard inkjet printer. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (61), 1–6. <https://doi.org/10.3791/3681>

Ozbolat, I. T. (2015). Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends in Biotechnology*, 33(7), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.005>

Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76, 321–343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>

Ozbolat, I. T., Peng, W., & Ozbolat, V. (2016). Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today*, 21(8), 1257–1271. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.006>

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 839–845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>

Panwar, A., & Tan, L. P. (2016). Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting. *Molecules*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060685>

Parak, A., Pradeep, P., du Toit, L. C., Kumar, P., Choonara, Y. E., & Pillay, V. (2019). Functionalizing bioinks for 3D bioprinting applications. *Drug Discovery Today*, 24(1), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.012>

Park, J. H., Jang, J., Lee, J. S., & Cho, D. W. (2016). Current advances in three-dimensional tissue/organ printing. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(6), 612–621. <https://doi.org/10.1007/s13770-016-8111-8>

Pati, F., Gantelius, J., & Svahn, H. A. (2016). 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(15), 4650–4665. <https://doi.org/10.1002/anie.201505062>

Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve RD productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 203–214. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>

Paulsen, & Miller. (2015). Tissue vascularization through 3D printing: will technology bring us flow? *Developmental Dynamics*, 1–26. <https://doi.org/10.1002/dvdy>.

Peng, W., Datta, P., Ayan, B., Ozbolat, V., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomaterialia*, 57(May), 26–46. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.025>

Peng, W., Unutmaz, D., & Ozbolat, I. T. (2016). Bioprinting towards Physiologically Relevant Tissue Models for Pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*, 34(9), 722–732. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.013>

Peters, S. A., Jones, C. R., Ungell, A. L., & Hatley, O. J. D. (2016). Predicting Drug Extraction in the Human Gut Wall: Assessing Contributions from Drug Metabolizing Enzymes and Transporter Proteins using Preclinical Models. *Clinical Pharmacokinetics*, 55(6), 673–696. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0351-6>

Poldervaart, M. T., Gremmels, H., Van Deventer, K., Fledderus, J. O., Öner, F. C., Verhaar, M. C., ... Alblas, J. (2014). Prolonged presence of VEGF promotes vascularization in 3D bioprinted scaffolds with defined architecture. *Journal of Controlled Release*, 184(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.007>

Pritchard, J. F., Jurima-Romet, M., Reimer, M. L. J., Mortimer, E., Rolfe, B., & Cayen, M. N. (2003). Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7), 542–553. <https://doi.org/10.1038/nrd1131>

Rabelink, T. J., Van Den Berg, B. M., Garsen, M., Wang, G., Elkin, M., & Van Der Vlag, J. (2017). Heparanase: Roles in cell survival, extracellular matrix remodelling and the development of kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13(4), 201–212. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.6>

Rosen, H., & Abribat, T. (2005). The rise and rise of drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(5), 381–385. <https://doi.org/10.1038/nrd1721>

Satpathy, A., Datta, P., Wu, Y., Ayan, B., Bayram, E., & Ozbolat, I. T. (2018a). Developments with 3D bioprinting for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(12), 1115–1129. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1542427>

Satpathy, A., Datta, P., Wu, Y., Ayan, B., Bayram, E., & Ozbolat, I. T. (2018b). Expert Opinion on Drug Discovery Developments with 3D bioprinting for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 00(00), 1–15. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1542427>

Saunders, R. E., & Derby, B. (2014). Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: Bioprinting. *International Materials Reviews*, 59(8), 430–448. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000040>

Skardal, A., Devarasetty, M., Soker, S., & Hall, A. R. (2015). In situ patterned micro 3D liver constructs for parallel toxicology testing in a fluidic device. *Biofabrication*, 7(3), 31001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/3/031001>

Stock, U. A., & Vacanti, J. P. (2001). *T ISSUE E NGINEERING : Current State and Prospects*. (1).

Supp, D. M., & Boyce, S. T. (2005). Engineered skin substitutes: Practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, 23(4), 403–412.

<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.023>

Takayama, K., Kawabata, K., Nagamoto, Y., Kishimoto, K., Tashiro, K., Sakurai, F., ... Mizuguchi, H. (2013). 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, *34*(7), 1781–1789. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.029>

Tarassoli, S. P., Jessop, Z. M., Al-sabah, A., Gao, N., Whitaker, S., Doak, S., & Whitaker, I. S. (2018). Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, *71*(5), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2017.12.006>

Tasoglu, S., & Demirci, U. (2013). Bioprinting for stem cell research. *Trends in Biotechnology*, *31*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.005>

Tekin, E., Smith, P. J., & Schubert, U. S. (2008). Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles. *Soft Matter*, *4*(4), 703–713. <https://doi.org/10.1039/b711984d>

Trenfield, S. J., Awad, A., Madla, C. M., Hatton, G. B., Firth, J., Goyanes, A., ... Basit, A. W. (2019). Shaping the future: recent advances of 3D printing in drug delivery and healthcare. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *16*(10), 1081–1094. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1660318>

Vaidya, M. (2015). Startups tout commercially 3D-printed tissue for drug screening. *Nature Medicine*, *21*(1), 2. <https://doi.org/10.1038/nm0115-2>

Van Midwoud, P. M., Verpoorte, E., & Groothuis, G. M. M. (2011). Microfluidic devices for in vitro studies on liver drug metabolism and toxicity. *Integrative Biology*, *3*(5), 509–521. <https://doi.org/10.1039/c0ib00119h>

VanDussen, K. L., Marinshaw, J. M., Shaikh, N., Miyoshi, H., Moon, C., Tarr, P. I., ... Stappenbeck, T. S. (2015). Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. *Gut*, *64*(6), 911–920. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306651>

Vermeulen, N., Haddow, G., Seymour, T., Faulkner-Jones, A., & Shu, W. (2017). 3D bioprint me: A socioethical view of bioprinting human organs and tissues. *Journal of Medical Ethics*, *43*(9), 618–624. <https://doi.org/10.1136/medethics-2015-103347>

Verneti, L., Gough, A., Baetz, N., Blutt, S., Broughman, J. R., Brown, J. A., ... Taylor, D. L. (2017). Functional Coupling of Human Microphysiology Systems: Intestine, Liver, Kidney Proximal Tubule, Blood-Brain Barrier and Skeletal Muscle. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep42296>

Vijayavenkataraman, S., Lu, W. F., & Fuh, J. Y. H. (2016). 3D bioprinting of skin: A state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication*, 8(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032001>

Villasante, A., & Vunjak-Novakovic, G. (2015). Tissue-engineered models of human tumors for cancer research. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(3), 257–268. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1009442>

Vukicevic, M., Mosadegh, B., Min, J. K., & Little, S. H. (2017). Cardiac 3D Printing and its Future Directions. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 10(2), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2016.12.001>

Vultur, A., Schanstra, T., & Herlyn, M. (2016). The promise of 3D skin and melanoma cell bioprinting. *Melanoma Research*, 26(2), 205–206. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000233>

Walters, B. D., & Stegemann, J. P. (2014). Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomaterialia*, 10(4), 1488–1501. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.038>

Wang, M. O., Vorwald, C. E., Dreher, M. L., Mott, E. J., Cheng, M. H., Cinar, A., ... Fisher, J. P. (2014). Evaluating 3D-printed biomaterials as scaffolds for vascularized bone tissue engineering. *Advanced Materials*, 27(1), 138–144. <https://doi.org/10.1002/adma.201403943>

Wang, X. (2019). *Advanced Polymers for Three-Dimensional (3D) Organ Bioprinting*. (Figure 1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/mi10120814>

Waring, M. J., Arrowsmith, J., Leach, A. R., Leeson, P. D., Mandrell, S., Owen, R. M., ... Weir, A. (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(7), 475–486. <https://doi.org/10.1038/nrd4609>

Weems, A. C., Pérez-Madrugal, M. M., Arno, M. C., Dove, A. P., Perez-madrugal, M. M., Arno, M. C., & Dove, A. P. (2020). 3D Printing for the Clinic: Examining

Contemporary Polymeric Biomaterials and Their Clinical Utility. *Biomacromolecules*, 21(3), 1037–1059. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01539>

Worthington, K. S., Wiley, L. A., Kaalberg, E. E., Collins, M. M., Mullins, R. F., Stone, E. M., & Tucker, B. A. (2017). Two-photon polymerization for production of human iPSC-derived retinal cell grafts. *Acta Biomaterialia*, 55, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.039>

Xu, F., Celli, J., Rizvi, I., Moon, S., Hasan, T., & Demirci, U. (2011). A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnology Journal*, 6(2), 204–212. <https://doi.org/10.1002/biot.201000340>

Xu, T., Rohozinski, J., Zhao, W., Moorefield, E. C., Atala, A., & Yoo, J. J. (2009). Inkjet-mediated gene transfection into living cells combined with targeted delivery. *Tissue Engineering - Part A*, 15(1), 95–101. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0095>

Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10(6), 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>

Yoon No, D., Lee, K. H., Lee, J., & Lee, S. H. (2015). 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab on a Chip*, 15(19), 3822–3837. <https://doi.org/10.1039/c5lc00611b>

Zhang, X., & Zhang, Y. (2015). Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(3), 777–782. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0531-x>

Zhang, Y. S., Duchamp, M., Oklu, R., Ellisen, L. W., Langer, R., & Khademhosseini, A. (2016). Bioprinting the Cancer Microenvironment. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(10), 1710–1721. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00246>

Zhang, Y. S., Yue, K., Aleman, J., Mollazadeh-Moghaddam, K., Bakht, S. M., Yang, J., ... Khademhosseini, A. (2017). 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 148–163. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1612-8>

Zhao, Y., Yao, R., Ouyang, L., Ding, H., Zhang, T., Zhang, K., ... Sun, W. (2014). Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro.

