

O emprego da prototipagem rápida na engenharia tecidual

The employment of rapid prototyping in tissue engineering

Alice Barros Câmara¹, Andressa de Oliveira Maia¹, Jonas Ivan Nobre Oliveira²

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

²Departamento de Biofísica e Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

Endereço para correspondência:

Alice Barros Câmara Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970, Natal, RN, Brasil.

Fax: +55-84-3342232335; Tel: +55-84-3342232335

E-mail: alicecamara@hotmail.com

Resumo

Pesquisas a respeito da engenharia tecidual empregando a prototipagem rápida estão ganhando cada vez mais importância na medicina regenerativa e cirurgias plásticas, uma vez que a prototipagem rápida otimiza o tempo e o custo de diversos procedimentos médicos. Estas pesquisas constituem um elemento importante para debate e subsidiam novas questões a serem exploradas. Esta revisão reuniu pesquisas que abordam diferentes técnicas de prototipagem rápida no campo da engenharia tecidual e que utilizam diferentes biomateriais na construção de arcabouços 3D. O trabalho resume as perspectivas futuras e discute o impacto destas pesquisas no conhecimento científico da medicina regenerativa. A busca em bancos de dados revelou que os testes mecânicos são os mais realizados, assim como culturas de células e a caracterização estrutural também são bastante consideradas. Em relação aos biomateriais, o Fosfato tricálcico/Fosfatos de cálcio e o Ácido poli lactico-co-glicólico estão entre os mais utilizados. Técnicas de deposição e de impressão são, respectivamente, as mais empregadas. Independente da técnica, as pesquisas destacam sua importância na área biomédica possibilitando um avanço tecnológico e uma abordagem alternativa aos métodos usuais de transplante, os quais necessitam de um órgão compatível com o receptor. O objetivo do presente estudo se consiste em revisar as diferentes pesquisas que empregam tecnologias de prototipagem rápida no campo da engenharia tecidual.

Palavras-chave: Transplante, arcabouços 3D, medicina regenerativa, biomateriais.

Abstract

Researches related to tissue engineering employing rapid prototyping is proving increasingly importance in regenerative medicine and plastic surgery, since rapid prototyping optimizes the time and cost of various medical procedures. These researches constitute an important element for discussion and support new issues to be explored. The following review article gathered researches that approach different techniques of rapid prototyping in the field of tissue engineering, using different biomaterials to the construction of 3D frameworks. The paper summarizes future perspectives and discusses the impact of these researches on the scientific knowledge of regenerative medicine. Researches in databases showed that mechanical tests are the main performed, as well as cell cultures and structural characterization are widely

considered. In relation to the biomaterials, tricalcium phosphate/calcium phosphates and poly lactic-co-glycolic acid are among the most used. Deposition and printing techniques are, respectively, the most applied. Regardless of the technique, researches highlight its importance in biomedical field, making it possible a technological advance and an alternative approach to the usual methods of transplantation, which require a receptor-compatible organ. The aim of the present study is to review the different researches that employ rapid prototyping technologies in tissue engineering.

Key words: Graft, 3D frameworks, regenerative medicine, biomaterials.

INTRODUÇÃO

As diversas áreas da ciência moderna evoluíram e ampliaram seu arsenal em busca de soluções mais baratas, rápidas e eficientes para responder seus paradigmas. Não obstante a isso se encontra a questão dos transplantes. Atualmente, buscam-se ferramentas biotecnológicas capazes de aprimorar os transplantes, visando fornecer menos riscos ao receptor.

No final da década de 80, surgiu um novo conceito que consiste em aplicar os princípios e métodos de engenharia e ciências da vida nas relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos ⁽¹⁾. Dessa forma, é possível o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou incrementar a função de tecidos. A engenharia tecidual (ET) é aplicada no estudo e desenvolvimento tecidual para restaurar os tecidos originais danificados. Esta foi a primeira definição de ET que, anos mais tarde, o Instituto Internacional de Pesquisa e Tecnologia, juntamente com a National Science Foundation aceitaram como identidade de um novo campo da ciência ⁽²⁾.

Atualmente, a engenharia tecidual tem se estabelecido como um campo da medicina regenerativa capaz de integralizar e convergir diversas áreas do conhecimento - biologia, genética, química, informática, além das engenharias de automação e de materiais - em prol do entendimento, mimetização, regeneração ou até mesmo construção de tecidos e órgãos totalmente funcionais ⁽³⁾. Dentro desse conjunto de conhecimentos, as técnicas de bioengenharia surgem e evoluem gradativamente. Nesse contexto, a prototipagem rápida (PR) vem impulsionando o campo biomédico desde o seu surgimento ⁽⁴⁾. PR é um nome genérico para um grupo de técnicas capazes de gerar um modelo físico a partir de dados de desing do computador ⁽⁵⁾. Entre as principais técnicas estão: a estereolitografia (SLA), técnicas à laser (tal como a sinterização laser seletiva -SLS), técnicas de impressão e técnicas de deposição e modelagem ⁽⁶⁾. Todas estas são capazes de fabricar objetos tridimensionais automaticamente, camada a camada, de acordo com o design virtual. Velocidade acelerada, aumento de eficiência e ausência da necessidade de muitas interações manuais são algumas das principais vantagens da PR. As técnicas de PR se dividem em três tipos: à base de líquido, à base de sólido e à base de pó. A SLA se consiste em uma tecnologia à base de líquido, enquanto que técnicas de modelagem e deposição são sistemas de base sólida. SLS e impressão estão incluídas no método à base de pó ⁽⁷⁾.

A estereolitografia foi a primeira técnica comercial de prototipagem rápida. Com elevada resolução e precisão, esta técnica é capaz de fabricar estruturas complexas tais como arcabouços altamente porosos e interconectados ^(8, 9). A técnica utiliza um polímero aquoso fotocurável como principal matéria-prima. Um feixe de laser ultravioleta é utilizado para irradiar determinados locais na superfície do polímero, seguido pela solidificação dessas áreas para fotopolimerização, enquanto que a região periférica permanece líquida. Depois de solidificar uma camada, a tabela de elevação se

move para a próxima camada e a camada endurecida é coberta com resina líquida. Ao repetir este processo, o molde 3D final é fabricado camada a camada. Em seguida, o excesso de resina é retirado ⁽⁶⁾.

A técnica SLS utiliza um feixe de laser de CO₂ para aquecer as partículas de pó, sinterizando o material para formar um modelo sólido sem entrar na fase de fusão. A medida que o modelo 3D é produzido, o pó é espalhado no objeto sinterizado, este processo se repete até o modelo estar completo ⁽⁶⁾. As fontes de materiais para SLS são amplas, na engenharia de tecido ósseo os arcabouços podem ser construídos com policaprolactona, ácido poli-l-lático, cerâmica inorgânica, entre outros biomateriais ⁽¹⁰⁻¹²⁾. A grande vantagem da SLS reside na sua capacidade de fabricar implantes metálicos que podem ser utilizados para reparar ossos ⁽¹³⁾. Nas técnicas de impressão, podem ser utilizados materiais como cerâmica, metais e polímeros sob a forma de um sólido ou nano partículas ⁽¹⁴⁾. No processo de impressão 3D (3DP), um fluxo de gotículas adesivas é expelido do cabeçote da impressora de tinta à jato. Estas gotículas são unidas seletivamente a uma fina camada de partículas de pó para formar uma forma sólida ⁽⁷⁾.

Entre as principais técnicas de deposição e modelagem, está a modelagem de deposição fundida (FDM). FDM foi a primeira técnica de PR baseada na extrusão de um polímero fundido. Materiais termoplásticos sob a forma de um filamento são utilizados como matéria-prima e um rolo de compressão é usado para empurrar o filamento, seguido pela extrusão de materiais fundidos na plataforma. Devido à temperatura relativamente baixa, os filamentos fundidos solidificam e depositam camada por camada para completar o modelo 3D. O controle preciso da temperatura é essencial para que este procedimento alcance a precisão desejada. A arquitetura do arcabouço é determinada pela velocidade de deposição, espaço entre filamentos, espessura da camada, ângulo de deposição, entre outros fatores ⁽¹⁵⁾. Os pesquisadores continuam ampliando a gama de materiais para FDM, como materiais compostos e nanomateriais ⁽¹⁶⁾.

O advento das impressoras 3D, a descoberta intermitente de novos biomateriais e o surgimento dos projetos de estruturas biológicas assistidas por computador (BioCad) despontaram no surgimento de pesquisas de aprimoramento da prototipagem rápida, com foco na avaliação da complexidade geométrica das superfícies e das formas anatômicas humanas durante a construção dos protótipos biológicos ⁽⁴⁾. Nesse prisma, a tecnologia PR estabeleceu-se como um processo ideal de fabricação de arcabouços ósseos. Estudos demonstram que as capacidades de fixação, diferenciação e proliferação de osteoblastos são otimizadas na PR ⁽¹⁷⁾. Avanços recentes em prototipagem rápida e tecnologia de impressão 3D também permitiram a fabricação de modelos 3D realistas de anatomia da cabeça e pescoço a serem usados em aplicações cirúrgicas ⁽¹⁸⁾.

A PR pode melhorar a fabricação de arcabouços controlando sua microestrutura, incorporando células nestes e regulando a distribuição celular. Estes fatores contribuem para o objetivo final da ET, que é produzir tecidos ou órgãos funcionais ⁽¹⁹⁾ além de arcabouços com arquitetura e força adequadas ⁽⁵⁾.

A fabricação por deposição à baixa temperatura (DLDM) representa uma das tecnologias de prototipagem rápida mais promissora pois não se baseia apenas no processo de fabricação de deposição rápida, mas também é integrada com o processo de separação de fases. DLDM foi empregada na fabricação de arcabouços para regeneração de osso, cartilagem, vasos sanguíneos e tecidos nervosos, sendo esta, uma tecnologia promissora na produção de estruturas semelhante ao andaime ideal, utilizando design de órgãos complexos ⁽²⁰⁾.

A engenharia de tecidos/medicina regenerativa promete resolver problemas relacionados ao transplante de órgãos, de forma que arcabouços projetados e fabricados

por BioCAD e prototipagem rápida possuem uma boa biocompatibilidade celular. Pesquisas recentes sugerem a viabilidade de usar este método na engenharia de tecido ósseo e terapia clínica ^(17, 21). Assim sendo, novas pesquisas devem focar no desenvolvimento de máquinas de PR projetadas especificamente para fabricação de tecidos ⁽⁷⁾, uma vez que tecnologias de PR foram capazes de reduzir o tempo e o custo de diversos processos. Nos campos da bioengenharia e das ciências da saúde, estas ferramentas podem oferecer soluções alternativas para procedimentos convencionais de diagnóstico, cirúrgico e terapêutico ⁽²²⁾. Dentro dessa perspectiva, este artigo tem por finalidade descrever e discutir diferentes estudos que englobam tecnologias de prototipagem rápida no campo da engenharia tecidual.

METODOLOGIA

Critérios de inclusão

Por tratar-se de uma Revisão Sistemática de Literatura de natureza descritiva, verificou-se a existência prévia de Revisões Sistemáticas sobre o tema proposto na Biblioteca Cochrane (The Cochrane Database of Systematic Reviews) e PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews), mas não foram encontradas revisões nesta área.

A busca dos estudos primários foi realizada nas bases de dados, PubMed/MEDLINE (Public MEDLINE) e a Scientific Eletronic Library Online (SciELO) através de uma estratégia de busca baseada no objeto de estudo. Para a composição da estratégia de busca, utilizou-se os termos do MeSH - Medical Subject Headings Terms, que foram aplicados na busca PUBMED/MEDLINE. Utilizou-se operadores lógicos de busca (parênteses, truncagem e aspas), além de delimitadores booleanos (AND, OR e NOT) (Quadro 1). As palavras-chave foram pesquisadas em português e inglês, e o período da busca foi de janeiro de 2002 a agosto de 2017.

Quadro 1. Estratégias de busca por bases de dados

Bases de Dados	Estratégia de Busca
PUBMED	("tissue engineering"[MeSH Terms] OR "rapid prototyping"[MeSH Terms] OR "3D framework"[MeSH Terms] OR "biomaterials"[MeSH Terms]) OR "raw materials".AND (English [lang])
SciELO	("engenharia tecidual" OR "prototipagem rápida" OR "arcabouços 3D" OR "biomateriais" OR "tissue engineering" OR "rapid prototyping" OR "3D framework" OR "biomaterials")

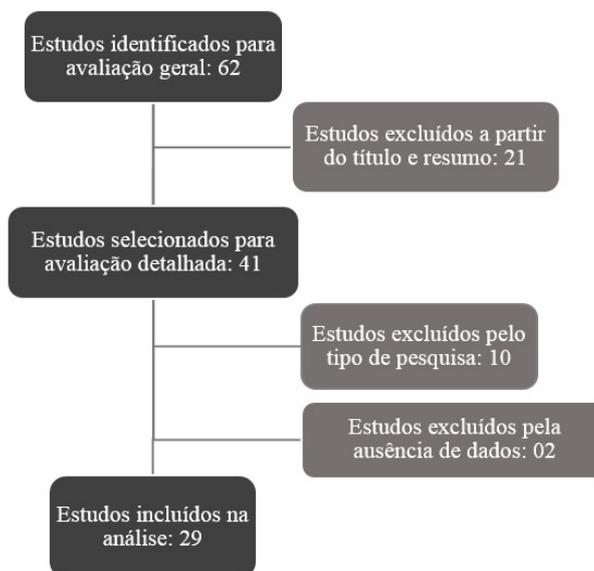
Os critérios de inclusão foram estudos: a) quantitativos, qualitativos ou quali-quantitativos que apresentassem resultados referentes aos impactos da engenharia tecidual com o emprego da tecnologia de prototipagem rápida na reconstrução ou criação de tecidos e órgãos como uma nova solução no campo da medicina regenerativa; b) com dados conclusivos; c) disponíveis nas línguas portuguesa e inglesa. Foram critérios de exclusão: normas técnicas, manuais, leis, resoluções, editoriais, cartas, comentários, resumo de anais e publicações duplicadas. Ou seja, incluímos na pesquisa apenas artigos científicos publicados em revistas indexadas.

A seleção dos estudos foi realizada por dois revisores de forma independente, e iniciou por meio da análise dos títulos dos artigos identificados a partir da estratégia de busca. Em seguida, foi realizada a análise dos resumos e, por fim, a análise do texto na íntegra dos artigos selecionados nas etapas anteriores. As discordâncias

entre os revisores foram resolvidas por consenso. A avaliação do risco de viés dos estudos individuais foi realizada a nível dos resultados, manualmente; assim, os estudos com viés que poderiam interferir nos resultados foram eliminados.

Diante dessa sistemática, os dados extraídos foram: identificação da publicação, biomaterial utilizado, técnica de prototipagem empregada, testes realizados e perspectivas futuras da pesquisa. Após organização dos dados extraídos, as informações foram apresentadas de forma descritiva por meio de tabelas e, subsequentemente, discutidas no corpo da revisão. Para analisar matematicamente as informações acima citadas, em nível de proporção/porcentagem, selecionamos apenas aqueles trabalhos que continham todas estas informações necessárias para as análises, portanto, a limitação de estudo refere-se ao número de artigos encontrados, o que poderia afetar em parte a evidência cumulativa. No entanto, a representação dos dados em termos de proporção reduz este viés. Os dados extraídos foram confirmados durante uma segunda análise e após a organização destes dados, as informações relevantes foram apresentadas de forma descritiva por meio de tabelas e, subsequentemente, discutidas no corpo da revisão. Adicionalmente, as informações de interesse foram compiladas no Excel, o qual forneceu os gráficos e as proporções referentes às variáveis analisadas.

O método de busca empregado apontou 62 artigos. Após a primeira avaliação, 21 estudos foram excluídos pela análise dos títulos e resumos, em ambos os casos por não estarem condizentes com a temática e os objetivos desta revisão. Após a leitura na íntegra dos artigos selecionados, 12 artigos foram excluídos por não atenderem os critérios de inclusão, ou ainda por atenderem os critérios de exclusão. Ao final, 29 artigos foram incluídos na revisão, sendo 26 artigos internacionais e 3 nacionais, disponíveis online em texto completo. Após a leitura seletiva dos textos escolhidos, as informações úteis foram extraídas e registradas (Esquema 1).



Esquema 1. Fluxograma – Busca pelos artigos.

RESULTADOS

As tabelas 1, 2 e 3 destacam os principais achados trazidos pelos artigos consultados.

Tabela 1. Comparação das pesquisas sobre prototipagem rápida na engenharia tecidual utilizando técnicas de deposição e modelagem.

Artigo/Ref.	Biomateriais	Técnicas	Testes realizados	Perspectivas futuras
Kai H et al. (23)	-Ácido poli lactico-co-glicólico -Fosfato tricálcico -P-quitosana -S-quitosana	DLDM (Fabricação e deposição em baixas temperaturas com agulha dupla)	Caracterização estrutural, testes de propriedades mecânicas, medição da absorção de água.	Promover a formação óssea e inibir a ação destrutiva de tumores aos ossos.
Woodfield TBF et al. (24)	-Poli etilenoglicol tereftalato -Poli tereftalato butileno	3DF (Deposição de fibras em 3D)	Cultura celular, ensaios de viabilidade celular, análises <i>in vivo</i> , avaliação da morfologia celular, histologia, análise bioquímica, imunohistoquímica, testes de propriedades mecânicas.	Desenvolver implantes osteocondrais.
Pang L et al. (25)	-β-Fosfato tricálcico -Ácido poli lactico-co-glicólico -Colágeno I -Apatita	LDM (Fabricação e deposição em baixas temperaturas)	Cultura de células, histologia, análises <i>in vivo</i> .	Permitir uma osteointegração completa na área defeituosa, promover o crescimento e o contato direto entre os ossos.
Hendrikx S et al. (26)	-Policaprolactona	FDM (modelagem de depósito fundido)	Testes de propriedades mecânicas, testes de biomineralização, cultura celular.	Ajustar propriedades mecânicas na regeneração do osso esponjoso.
Xiao W et al. (27)	-Vidro de silicato bioativo(13-93)	FEM (modelagem de elementos finitos)	Testes mecânicos de flexão e compressão, histologia, análises <i>in vivo</i> , análise histomorfométrica.	Reparar a estrutura óssea, fornecendo resistência a compressão.
Su R et al. (28)	-Acrilonitrilo butadieno estireno	FDM (modelagem de depósito fundido)	Testes mecânicos de compressão, torção, dobra e deformação.	Otimizar as propriedades mecânicas e a adaptação dos arcabouços ósseos.
Yu D et al. (29)	-Ácido poli lactico-co-glicólico -Fosfato tricálcico	Modelagem com extrusão a baixas temperaturas	Avaliação da porosidade, tamanho dos poros, cicatrização de feridas, osteogênese e propriedades biomecânicas do implante, histologia.	Reparar ossos com defeitos, melhorando sua estrutura, resistência mecânica, propriedades biológicas e capacidade osteogênica.
Huang Y et al. (30)	-Poliuretano -Hidrogel	DLDM (Fabricação e deposição em baixas temperaturas com agulha dupla)	Cultura celular, avaliação da sobrevivência e proliferação celular, análises <i>in vivo</i> .	Produzir órgãos complexos no futuro.
Esposito AR et al. (31)	-Poli (L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato)	FDM (modelagem de depósito fundido)	Análise do tamanho, conexão dos poros e da microestrutura do arcabouço, análises termogravimétricas e dinâmico-mecânica, ensaio de compressão.	Otimizar a regeneração de tecidos utilizando polímeros biorreabsorvíveis
Pinto MOCM et al. (32)	-Poli ácido láctico	FDM (modelagem de depósito fundido)	Análise da morfologia celular, ensaio de citotoxicidade, ensaio de biocompatibilidade <i>in vivo</i> , histologia.	Otimizar a viabilidade celular e biocompatibilidade dos acabamentos.

Tabela 2. Comparação das pesquisas sobre prototipagem rápida na engenharia tecidual utilizando técnicas de impressão e estereolitografia.

Artigo/Ref.	Biomateriais	Técnicas	Testes realizados	Perspectivas futuras
Schumacher M et al. (33)	-Hidroxiapatita -β-Fosfato tricálcico	Impressão a jato	Avaliação da resistência a compressão, influência da macroporosidade e geometria dos poros na força das amostras.	Melhorar propriedades mecânicas e bioativas do implante, fabricar enxertos ósseos específicos do paciente, otimizar a integração dos implantes.
Shankaran G et al. (34)	-Acrilonitrilo butadieno estireno - M30Termoplástico	Estereolitografia	Análises do volume, contorno e estética do olho artificial.	Fabricar próteses oculares com maior custo-benefício.
Wilson CE et al. (35)	-Hidroxiapatita	Impressão 3D	Análises da estrutura do arcabouço, análise histomorfométrica, histologia, cultura de células, análises <i>in vivo</i> .	Favorecer a formação óssea.
Dhariwala B et al. (36)	-Hidrogéis fotopolimerizáveis	Estereolitografia	Avaliação da capacidade de absorção de água, caracterização mecânica, cultura de células, testes de citotoxicidade e de viabilidade celular.	Construir tecidos biológicos complexos, encapsular células tronco e diferencia-las em tipos celulares apropriados, reparar cartilagens.
Quadrani P et al. (37)	-Hidroxiapatita	Estereolitografia	Análise morfométrica, avaliação da porosidade e tamanho do poro.	Formar tecido ósseo utilizando biomateriais com funções biomiméticas ósseas eficientes.
Sodian R et al. (38)	-Ácido poliglicólico -Poli-4-hidroxibutirato	Estereolitografia	Avaliação da estrutura do Biomaterial.	Formar um autólogo substituto de tecido cardiovascular para implantação cirúrgica.
Taylor PM et al. (39)	-Colágeno bovino de tipo I	Impressão 3D	Cultura de células, avaliação da viabilidade celular, ensaios de proliferação e morte celular.	Otimizar projetos de arcabouços biológicos para válvulas cardíacas, criar arcabouços compatíveis com necessidades específicas das células intersticiais da válvula e aumentar a viabilidade, proliferação e função celular.
Yeong WY et al. (40)	-Colágeno tipo I	Impressão 3D	Análise dimensional do encolhimento, análise da morfologia interna do arcabouço, avaliação da porosidade.	Permitir a transmissão de estímulos mecânicos nas células, possibilitando o arcabouço como um biorreator.
Lopez-Heredia MA et al. (41)	-Titânio poroso -Fosfato de cálcio	Impressão 3D	Caracterização dos arcabouços, cultura celular, análises <i>in vivo</i> , histologia.	Reconstruir grandes partes esqueléticas no campo da ortopedia e maxilo-facial.
Schumacher M et al. (42)	-Hidroxiapatita -Trifosfato de cálcio -Fosfato de cálcio bifásico	Impressão à jato	Cultura celular, avaliação da distribuição, morfologia, proliferação e diferenciação celular.	Regenerar adequadamente defeitos ósseos individuais.
Maurmann N et al. (43)	-Policaprolactona -Ácido poli lactico-co-glicólico	Impressão 3D	Análise morfológica, caracterização e cultura de células, ensaios de citotoxicidade	Produzir um suporte que pode ser utilizado na terapia celular e medicina regenerativa.

Tabela 3. Comparação das pesquisas sobre prototipagem rápida na engenharia tecidual utilizando variadas técnicas.

Artigo/Ref.	Biomateriais	Técnicas	Testes realizados	Perspectivas futuras
Tirella A et al. (44)	-Alginato	PAM2 (microseringa assistida por pistão)	Ensaio de viabilidade celular, testes metabólicos, avaliação das tensões de cisalhamento na membrana celular.	Permitir uma troca eficiente de nutrientes e fornecer uma arquitetura 3D organizada para as células.
Martínez-Vázquez FJ et al. (45)	-Pó de HASI e -Gelatina tipo A	Tecnologia de plotagem em 3D especial (EnvisionTEC GmbH)	Caracterização estrutural, química, mecânica e biológica, medições do ângulo de contato, análises da liberação do fármaco <i>in vitro</i> e da inibição do crescimento bacteriano.	Promover a regeneração óssea, permitindo uma adequada vascularização e troca de fluidos, inibindo o crescimento bacteriano.
Wang J et al. (46)	-Apatita-colágeno-policaprolactona	Estratégia de fabricação de funcionalização biomimética 3D	Avaliação da porosidade, tamanho do poro, hidrofília, absorção de água e viabilidade celular, testes de propriedades mecânicas, ensaios de citotoxicidade e de proliferação celular, histologia, análises <i>in vivo</i> , análise histomorfométrica.	Aumentar a capacidade de adesão e proliferação celular, regeneração óssea, osteointegração e deposição óssea.
Landers R et al. (47)	-Hidrogéis termorresistíveis	Tecnologia de plotagem em 3D	Cultura celular, teste de proliferação celular, análise micro tomográfica.	Facilitar a adesão celular e crescimento celular.
Hoque ME et al. (48)	-Poli (etileno)glicol) bloco-poli (epsilon-caprolactona) bloco-poli (DL-lactideo)	DRBME (Extrusão e fusão baseado em robótica)	Caracterização da morfologia e propriedades mecânicas dos arcabouços, culturas celulares, análise da morfologia celular.	Utilizar efetivamente o polímero (PEG-PCL-P(DL)LA) na clínica e na engenharia dos tecidos.
Warnke PH et al. (49)	-Liga de titânio (Ti6Al4V)	SLM (Fusão a laser seletivo)	Cultura celular, testes de biocompatibilidade, de resistência à força compressiva, de viabilidade e proliferação celular, avaliação da porosidade, tamanho do poro e morfologia celular.	Produzir arcabouços biocompatíveis e resistentes a força compressiva.
Park SE et al. (50)	-Policaprolactona -Ácido poli lactico-co-glicólico	Sistema de plotagem <i>Bio & Scaffold</i>	Testes de biocompatibilidade, de toxicidade e de viabilidade celular, cultura celular, análises <i>in vivo</i> , testes mecânicos, histologia, análises morfológicas.	Regenerar completamente tecidos ósseos com grandes defeitos.
Hoque ME (51)	-Policaprolactona -PolicaPRrolactona-poli(etileno)glicol	DRBPR (prototipagem rápida baseada em robótica)	Avaliação das propriedades mecânicas e morfológicas, mensuração da porosidade, estudo de degradação <i>in vitro</i> .	Otimizar propriedades biomecânicas dos arcabouços, diminuindo sua degradação.

A maior parte dos trabalhos analisados nessa revisão (Tabelas 1, 2 e 3) buscava a construção de arcabouços para o reparo ósseo⁽²⁵⁻²⁹⁾. O uso de biomateriais a base de quitosana pode ser promissor na reestruturação óssea em relação a tumores invasivos que precisam ser removidos⁽²³⁾. A construção de pequenas articulações por deposição de fibras tridimensionais aparenta ser uma boa alternativa para reparar esse tipo de tecido, necessitando de estudos mais complexos para melhorar a qualidade da cartilagem⁽²⁴⁾.

Análises radiográficas demonstraram formação óssea em coelhos com o uso de biomateriais a base de colágeno I/apatite, mostrando que esse composto pode servir como base para uma ferramenta promissora na reconstrução óssea⁽²⁵⁾. Arcabouço de apatite-colágeno-policaprolactona (Ap-Col-PCL) foi desenvolvido combinando tecnologia de fabricação de prototipagem rápida e uma estratégia de funcionalidade em 3D. Estudo demonstrou que as reconstruções de Ap-Col-PCL exibem uma propriedade mecânica favorável, mais crescimento do tecido ósseo e melhor capacidade de osteointegração⁽⁴⁶⁾.

Arcabouços macroporosos podem ser produzidos com derivados de vidro híbrido sol-gel, o que permite que as células do tecido cresçam mais profundamente no arcabouço e melhore a regeneração do osso esponjoso⁽²⁶⁾. Um osso artificial composto de poli lactide-co-glicolide (PLGA)/fosfato tricálcico (TCP) foi pré-fabricado utilizando a tecnologia de prototipagem rápida de baixa temperatura e testado em cabras, mostrando que o arcabouço formado fornece boa estrutura tridimensional após a adição de osso humano recombinante, fornecendo também uma excelente osteogênese⁽²⁹⁾. Estudo com poliuretano/hidrogel de alginato/fibrinogênio mostrou uma resposta a formação de sistemas vasculares ramificados, permitindo boa aplicação clínica através do uso da técnica DLDM⁽³⁰⁾.

Estudos que buscam a melhora das qualidades químicas e físicas dos arcabouços são realizados constantemente, com o objetivo de fornecer força e resistência aos materiais de sustentação e regeneração a tecidos perdidos. Alguns arcabouços porosos foram desenvolvidos no Brasil, estes foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, cromatografia de permeabilidade em gel, calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica, ensaio mecânico de compressão e análise dinâmico-mecânica. As análises confirmaram que a técnica de deposição de fibras 3D é uma poderosa ferramenta para a fabricação de arcabouços caracterizados por tamanho dos poros precisos e uma microestrutura reprodutível. Esses estudos mostraram que biomateriais reabsorvíveis representam uma alternativa promissora para regeneração tecidual^(31, 32).

Casos de traumas crânio-faciais são marcantes para os pacientes, uma vez que além dos problemas físicos, causam ainda prejuízos psicológicos. A reconstrução crânio-maxilo-faciais, através de técnicas de prototipagem rápida, refletem a recuperação do tecido do paciente, bem como uma nova perspectiva de retorno ao bem-estar do mesmo⁽³⁴⁾. Arcabouços de fosfato de cálcio com estruturas definidas e reprodutíveis, forneceram um método funcional para construção de tecido ósseo superficial. Os arcabouços foram semeados com células estromais de medula óssea de cabra cultivadas e implantadas subcutaneamente em camundongos por 4 ou 6 semanas. A histologia revelou formação óssea mineralizada em todos os arcabouços para ambos os períodos de implantação. Após 4 semanas, os ossos estavam presentes principalmente como uma camada em superfícies. Após 6 semanas, a formação do osso superficial foi acompanhada por brotamento ósseo da superfície e por ponte ocasional de poros⁽³⁵⁾.

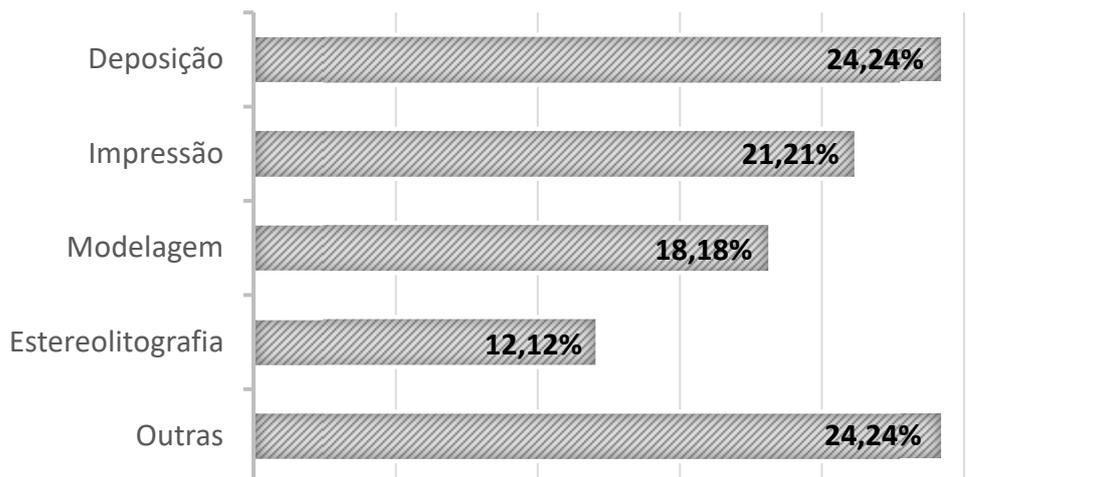


Figura 1. Técnicas de prototipagem rápida utilizadas nas pesquisas consideradas no artigo.

A pesquisa nos bancos de dados também revelou que os Fosfatos tricálcico ou Fosfatos de cálcio e o Ácido poli lactico-co-glicólico são os principais componentes dos biomateriais utilizados, respectivamente. A Hidroxiapatita também é bastante utilizada, assim como o Colágeno tipo 1 e alguns tipos de hidrogéis (Figura 2). Juntos, estes biomateriais compreendem 44,67% dos incluídos na pesquisa, os quais totalizaram 47.

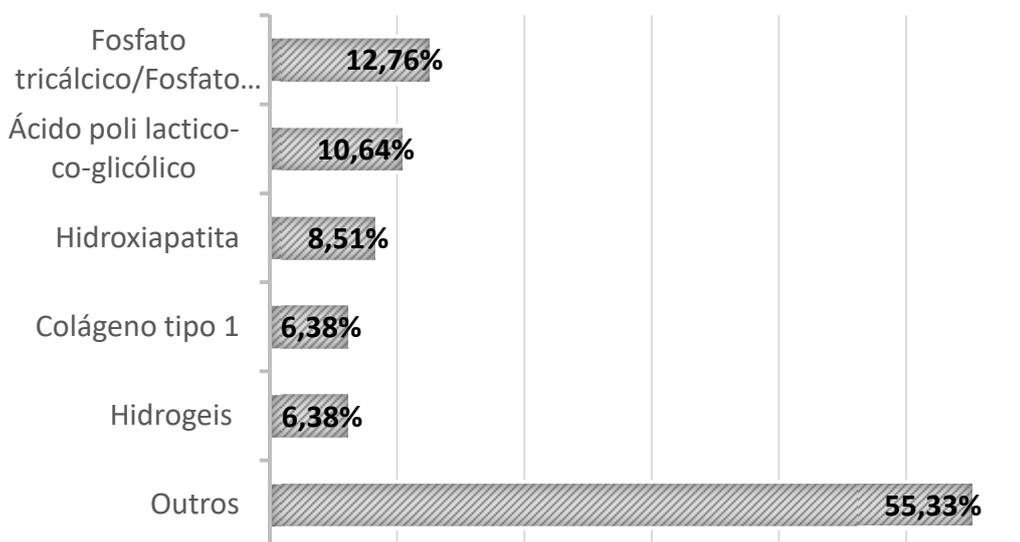


Figura 2. Biomateriais utilizados nas pesquisas consideradas no artigo.

Por fim, observou-se que os testes de propriedades mecânicas são os mais realizados nas experimentações envolvendo prototipagem rápida e engenharia tecidual (Figura 3). Estes testes englobam análises da compressão, flexão, torção, deformação do arcabouço, entre outros. O resultado da busca em banco de dados mostrou que a cultura celular e a caracterização estrutural do arcabouço também são bastante realizadas. Além

destas, as pesquisas consideraram amplamente as análises histológicas e de morfologia e viabilidade celular. Estes seis testes compreendem 57,02% de um total de 114 considerados na pesquisa.

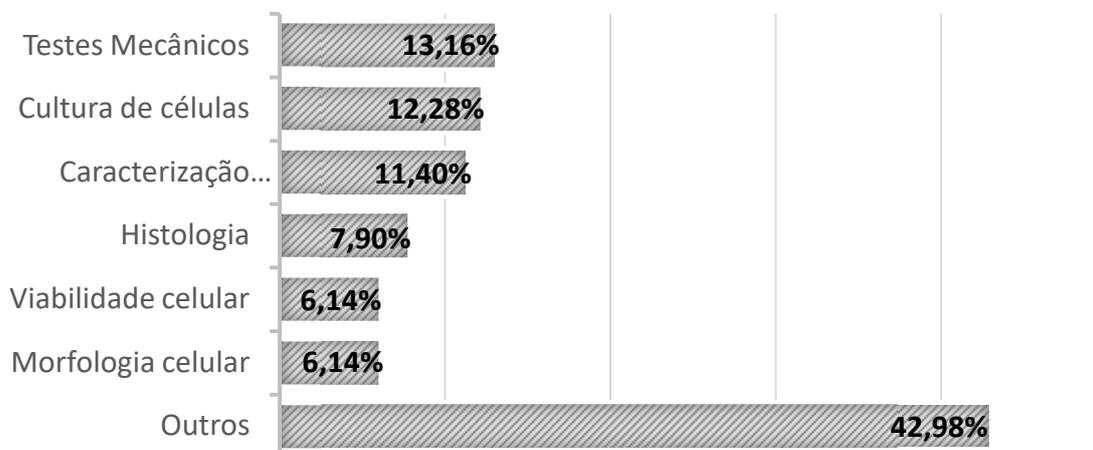


Figura 3. Testes realizados nas pesquisas consideradas no artigo.

Estudos abordando a reconstrução óssea de diferentes partes do corpo, construção de cartilagens, modelos cardiovasculares, próteses maxilo-faciais e melhoria dos arcabouços tridimensionais utilizados na engenharia de tecidos baseada em técnicas de prototipagem rápida são caracterizados nesse artigo. No entanto, a busca de artigos revelou que a maior parte das pesquisas sobre prototipagem rápida na engenharia tecidual são direcionadas ao tecido ósseo, enquanto que pesquisas envolvendo outros tecidos são realizadas em uma menor escala (Tabelas 1, 2 e 3).

DISCUSSÃO

Esta revisão permitiu uma percepção global sobre os modelos, métodos e técnicas de avaliação do emprego da prototipagem rápida na engenharia tecidual que tem sido utilizado nos últimos anos, através da utilização de uma metodologia sistemática. A maioria dos estudos analisados mostrou uma boa perspectiva de aplicação clínica. Os artigos apresentam diferentes metodologias de prototipagem rápida que possuíam o objetivo comum de promover a construção e reconstrução de tecidos, visando a sua funcionalidade e estabilidade. A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar amplo, a qual visa desenvolver tecnologias que possibilitem a construção ou melhoria de tecidos perdidos. Esta tecnologia faz a reposição fisiológica e morfológica de tecidos ou prejudicados. Os arcabouços que servirão de base para essa terapia são baseados em tecidos biológicos, com o objetivo de minimizar a rejeição da estrutura a ser implantada. A reconstrução óssea tem grande importância na engenharia de tecidos. O fornecimento de uma matriz biologicamente ativa através do arcabouço de sustentação permite que o tecido seja constantemente formado. Estudos com o cultivo de células do próprio paciente fornecendo essa atividade confere uma maior aplicabilidade e funcionalidade a técnica.

As técnicas de prototipagem rápida permitem personalizar e fabricar arcabouços porosos em três dimensões. A PR desenvolve o arcabouço sintético a partir de uma imagem digitalizada. O processo de criação de objetos 3D através de deposição repetitiva de camadas de materiais, usando equipamentos controlados por computador, com base em dados obtidos a partir do corte de um modelo. Os trabalhos avaliados na revisão utilizaram técnicas de PR que permitiam analisar o uso de biomateriais adequados a construção do arcabouço, levando em consideração parâmetros como a porosidade, tamanho do poro, forma do poro, permeabilidade, capacidade de reabsorção e de fornecer matriz biológica. Além disso, as técnicas de PR permitem a investigação do efeito da geometria do arcabouço no comportamento das células para uma maior compatibilidade com o local de implantação, fornecendo uma estrutura que imite o tecido natural a ser substituído com boa funcionalidade.

Contudo, pode-se verificar que os arcabouços construídos por deposição polimérica ou técnicas de PR baseadas em extrusão, sempre apresentaram boa conexão com estruturação de bases regulares e reprodutíveis. O processo de distribuição possui vantagens como a flexibilidade de suporte para o arcabouço. Porém, a principal desvantagem deste método é a alta sensibilidade da concentração de materiais. Além disso, devido à frequente distorção de filamentos durante a extrusão de material causa falha no processo, limitando assim as escolhas do material utilizado. Consequentemente, esse problema impede um processo automático e contínuo que reduz a principal vantagem de um sistema de arcabouços baseado em filamentos.

Os arcabouços existentes baseados em CAD são constituídos de redes cúbicas, com bordas retas e voltas afiadas ou derivadas de interseções primitivas geométricas, como esferas e cilindros. Nenhuma dessas partições fornece um ambiente biomórfico adequado para adesão celular, migração e proliferação. A geometria biomórfica que melhor imita essa configuração estrutural seria superfícies que são contínuas através do espaço e divididas em dois, não necessariamente iguais. As biocompatibilidades de vários polímeros não foram provadas de forma conclusiva até agora. Apesar da disponibilidade atual de inúmeros materiais biodegradáveis, geralmente nenhum material único é capaz de fornecer o andaime com todas as propriedades necessárias para aplicações na engenharia de tecidos e órgãos. Assim, o principal desafio no desenvolvimento de um arcabouço consiste principalmente na escolha de um único ou de uma mistura adequada de biomateriais com a combinação correta de propriedades (48).

Um estudo mostrou que os arcabouços porosos de Titânio criados usando método seletivo de derretimento a laser (SLM) são biocompatíveis e permitem o crescimento extenso de todos os poros de 0,5 mm e de uma proporção significativa na faixa de 0,5-0,6 mm por osteoblastos, que mostram uma morfologia bem disseminada. A resistência à força compressiva pode ser adaptada alterando a largura dos poros, melhorando a aplicabilidade biológica do arcabouço (49). A comparação e combinação de materiais mostram que a técnica de PR é uma ferramenta promissora para a fabricação de bases estruturais cujas características permitem que as células penetrem no centro do arcabouço, tornando-o mais desejável para a regeneração do tecido ósseo, especialmente em defeitos de grande extensão.

Pesquisas avaliando as técnicas de PR que utilizam biomateriais poli (ε-caprolactona) (PCL) e poli (ácido D, L-láctico-glicólico) (PLGA) sozinhos foram analisadas. A mesma verificou a aplicabilidade da técnica e dos materiais *in vivo*, onde animais foram acompanhados por 12 semanas utilizando os arcabouços nas áreas de defeito sem células, esperando o recrutamento de células vizinhas. Os testes *in vitro* sugerem que PLGA e PCL são materiais seguros, embora PCL seja preferível. O

andaime PCL fabricado usando a técnica PR para defeitos de maior extensão, é promissor para a regeneração do tecido ósseo mesmo sem transportar células antes da inserção⁽⁵⁰⁾.

Polímeros sintéticos apresentam bons resultados na modulação da hidrofiliabilidade e degradabilidade, variando os componentes dos polímeros e, conseqüentemente, as propriedades biomecânicas dos arcabouços. O estudo de degradação acelerada não fornece informações conclusivas que ocorram no ambiente fisiológico real, em vez disso, este procedimento permite a comparação da degradabilidade entre diferentes padrões e materiais de andaime em um período de tempo mais aceitável⁽⁵¹⁾.

Verificou-se em alguns estudos o desenvolvimento de uma reconstrução composta Ap-Col-PCL combinando tecnologia de fabricação de PR e uma estratégia de funcionalização 3D de incorporação de colágeno e deposição biomimética. A construção mostra características favoráveis com os três níveis nano-micro-macro de arquiteturas, propriedades mecânicas semelhantes às do osso esponjoso, biodegradabilidade e excelente bioatividade para promover a regeneração óssea rápida no modelo segmentar do defeito ósseo longo em coelhos. Além disso, também pode aproveitar ao máximo os recursos de fabricação avançados da tecnologia na PR, particularmente a viabilidade de fabricar formas e estruturas customizadas de acordo com imagens médicas. Portanto, as construções Ap-Col-PCL demonstraram grande potencial de substituição efetiva do enxerto ósseo para o tratamento de defeitos de grande extensão. Logo, a técnica combinada a esses biomateriais pode aproveitar as vantagens da PR, facilitando a personalização da forma e tamanho dos implantes de acordo com imagens médicas, melhorando a aplicabilidade na clínica⁽⁴⁶⁾.

A prototipagem rápida ainda se depara com alguns desafios. Apesar de ser a técnica mais antiga e uma das mais utilizadas, a estereolitografia apresenta a desvantagem da escassez de resina biocompatível necessária para o processo⁽⁵²⁾. No entanto os pesquisadores estão buscando ampliar os tipos de polímeros utilizados na SLA, assim como aplicar múltiplos materiais nesta técnica⁽⁵³⁾. A eficácia da SLS é determinada pelo tamanho do pó, diâmetro do raio do laser e transferência de calor. Dessa forma, a condução de calor durante o processo pode causar a fusão indesejável de partículas de pó periféricas, limitando a resolução da construção do arcabouço. Apesar de serem bastante promissoras, as técnicas de impressão e modelagem também podem apresentar algumas desvantagens. O tempo para fabricação do arcabouço pode ser relativamente longo, os processos de aquecimento dificultam a incorporação de biomoléculas em arcabouços, uma superfície lisa que não é apropriada para a adesão celular, precisa de modificação ou revestimento adicional e por fim, é difícil estabelecer uma microporosidade que promova neovascularização e crescimento celular⁽⁶⁾.

Em relação às técnicas de impressão, os produtos finais podem possuir força biomecânica fraca, requerendo sinterização a alta temperatura para obter estruturas adequadas para engenharia de tecido ósseo⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾. Ao contrário da técnica FDM, a 3DP não necessita de estruturas de suporte extras, porém a remoção do pó não ligado é um desafio na engenharia tecidual⁽⁵⁹⁾. No entanto, a exploração de melhores alternativas está em andamento⁽⁶⁰⁾. Pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de minimizar ou eliminar tais desvantagens e deficiências das técnicas de PR, melhorando assim a eficiência, reprodutibilidade e biocompatibilidade dos arcabouços para a engenharia de tecido ósseo.

Nesse contexto, as técnicas de PR aplicadas na engenharia de tecidos e órgãos é uma combinação que auxilia na melhoria da qualidade de vida de pacientes vítimas de acidentes, permitindo a reconstrução de tecidos ou órgão perdidos. Estudos constantes

são realizados na busca por biomateriais que forneçam a estabilidade, funcionalidade e resistência ideais de acordo com a necessidade do tecido a ser regenerado, auxiliando na reinserção do paciente na vida social. Sabe-se que o tecido ósseo é o mais amplamente pesquisado, no entanto é essencial que outros tecidos também sejam incluídos em pesquisas futuras que envolvam prototipagem rápida e a engenharia tecidual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vacanti JP, Vacanti CA. The history and scope of tissue engineering. In: Principles of tissue engineering. 3 ed. Eds Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Oxford: Elsevier, pp. 3-6, 2000.
2. Monteiro do Nascimento MH, Bertachini Lombello C. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 26: 360-370, 2016.
3. Falanca V, Faria K. Bioengineered skin constructs. In: Principles of tissue engineering. 3 ed. Eds Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Oxford: Elsevier, pp.1167-1186, 2000.
4. MuPRhy M, Mikos AG. Polymer Scaffold Fabrication. In: Principles of tissue engineering. 3 ed. Eds Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Oxford: Elsevier, pp.1167-1186, 2000.
5. Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology*, 22: 643-652, 2004.
6. Yuan B, Zhou SY, Chen XS. Rapid prototyping technology and its application in bone tissue engineering. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18: 303-315, 2017.
7. Peltola SM, Melchels FP, Grijpma DW, Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of medicine*, 40: 268-280, 2008.
8. Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31: 6121-6130, 2010.
9. Lee JW, Kang KS, Lee SH, Kim JY, Lee BK, Cho DW. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly (propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials*, 32: 744-752, 2011.
10. Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, Hollister SJ, Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 26: 4817-4827, 2005.
11. Tan KH, Chua CK, Leong KF, Cheah CM, Gui WS, Tan WS, Wiria FE. Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. *Bio-medical materials and engineering*, 15: 113-124, 2005.

12. Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 6: 4495-4505, 2010.
13. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of biological engineering*, 9: 4, 2015.
14. Liu H, Webster TJ. Enhanced biological and mechanical properties of well-dispersed nanophase ceramics in polymer composites: from 2D to 3D printed structures. *Materials Science and Engineering*, 31: 77-89, 2011.
15. Chua CK, Leong KF, An J. Introduction to rapid prototyping of biomaterials. In: *Rapid prototyping of biomaterials*. Eds., Narayan R. Philadelphia: Woodhead Publishing, pp. 1-15, 2014.
16. Li Y, Wu ZG, Li XK, Guo Z, Wu SH, Zhang YQ, Shi L, Teoh SH, Liu YC, Zhang ZY. A polycaprolactone-tricalcium phosphate composite scaffold as an autograft-free spinal fusion cage in a sheep model. *Biomaterials*, 35: 5647-5659, 2014.
17. He C, Xia L, Luo Y, Wang Y. The application and advancement of rapid prototyping technology in bone tissue engineering. *Journal of biomedical engineering*, 21: 871-875, 2004.
18. Chan HH, Siewerdsen JH, Vescan A, Daly MJ, Prisman E, Irish JC. 3D rapid prototyping for otolaryngology—head and neck surgery: applications in image-guidance, surgical simulation and patient-specific modeling. *PloS one*, 10: e0136370, doi:10.1371/journal.pone.0136370, 2015.
19. Li MG, Tian XY, CHEN XB. A brief review of dispensing-based rapid prototyping techniques in tissue scaffold fabrication: role of modeling on scaffold properties prediction. *Biofabrication*, 1: 032001, doi: 10.1088/1758-5082/1/3/032001, 2009.
20. Liu W, Wang D, Huang J, Wei Y, Xiong J, Zhu W, Duan L, Chen J, Sun R, Wang D. Low-temperature deposition manufacturing: A novel and promising rapid prototyping technology for the fabrication of tissue-engineered scaffold. *Materials Science and Engineering*, 70: 976-982, 2017
21. Xian SQ, Chai F, Zhao YM, Wang ZY, Liu XF, Li TC. Experimental study of periosteal osteoblasts adhesion to artificial bone scaffolds based on rapid prototype. *West China journal of stomatology*, 22: 248-251, 2004.
22. Lantada AD, Morgado PL. Rapid prototyping for biomedical engineering: current capabilities and challenges. *Annual review of biomedical engineering*, 14: 73-96, 2012.
23. Kai H, Wang X, Madhukar KS, Qin L, Yan Y, Zhang R, Wang X. Fabrication of a two-level tumor bone repair biomaterial based on a rapid prototyping technique. *Biofabrication*, 1: 025003, doi: 10.1088/1758-5082/1/2/025003, 2009.

24. Woodfield TBF, Guggenheim M, Von Rechenberg B, Riesle J, Van Blitterswijk CA, Wedler, V. Rapid prototyping of anatomically shaped, tissue-engineered implants for restoring congruent articulating surfaces in small joints. *Cell proliferation*, 42: 485-497, 2009.
25. Pang L, Hao W, Jiang M, Huang J, Yan Y, Hu Y. Bony defect repair in rabbit using hybrid rapid prototyping polylactic-co-glycolic acid/ β -tricalciumphosphate collagen I/apatite scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells. *Indian journal of orthopaedics*, 47: 388-394, 2013.
26. Hendrikx S, Kascholke C, Flath T, Schumann D, Gressenbuch M, Schulze FP, Hacker MC, Schulz-Siegmund M. Indirect rapid prototyping of sol-gel hybrid glass scaffolds for bone regeneration—Effects of organic crosslinker valence, content and molecular weight on mechanical properties. *Acta biomaterialia*, 35: 318-329, 2016.
27. Xiao W, Zaeem MA, Bal BS, Rahaman MN. Creation of bioactive glass (13–93) scaffolds for structural bone repair using a combined finite element modeling and rapid prototyping approach. *Materials Science and Engineering: C*, 68: 651-662, 2016.
28. Su R, Campbell GM, Boyd SK. Establishment of an architecture-specific experimental validation approach for finite element modeling of bone by rapid prototyping and high resolution computed tomography. *Medical engineering & physics*, 29: 480-490, 2007.
29. Yu D, Li Q, Mu X, Chang T, Xiong Z. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 37: 929-934, 2008.
30. Huang Y, He K, Wang X. Rapid prototyping of a hybrid hierarchical polyurethane-cell/hydrogel construct for regenerative medicine. *Materials Science and Engineering: C*, 33: 3220-3229, 2013.
31. Esposito A, Motta AC, Messias A, Martins K, Melo V, Duek EAR. Processamento de arcabouços de PL-co-DLA-co-TMC pelo método de deposição de fibras 3D para engenharia tecidual. In: VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal/RN. 2012.
32. Pinto MOM, Maia MC, Thiré RM. Estudo da biocompatibilidade *in vivo* de arcabouço de poli (ácido láctico) (PLA) fabricados por impressão 3D para aplicações em engenharia tecidual. In: 9º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Foz do Iguaçu/PR. 2016.
33. Schumacher M, Deisinger U, Detsch R, Ziegler G. Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 3119-3127, 2010.

34. Shankaran G, Deogade SC, Dhirawani R. Fabrication of a Cranial Prosthesis Combined with an Ocular Prosthesis Using Rapid Prototyping: A Case Report. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, 13: 68-72, 2016.
35. Wilson CE, de Bruijn JD, Van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJA. Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *Journal of biomedical materials research Part A*: 68: 123-132, 2004.
36. Dhariwala B, Hunt E, Boland T. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue engineering*, 10: 1316-1322, 2004.
37. Quadrani P, Pasini A, Mattioli-Belmonte M, Zannoni C, Tampieri A, Landi E, Giantomassi F, Natali D, Casali F, Biagini G, Tomei-Minardi A. High-resolution 3D scaffold model for engineered tissue fabrication using a rapid prototyping technique. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 43: 196-199, 2005.
38. Sodian R, Fu P, Lueders C, Szymanski D, Hetzer R. Tissue engineering of vascular conduits: fabrication of custom-made scaffolds using rapid prototyping techniques. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 53: 144-149, 2005.
39. Taylor PM, Sachlos E, Dreger SA, Chester AH, Czernuszka JT, Yacoub MH. Interaction of human valve interstitial cells with collagen matrices manufactured using rapid prototyping. *Biomaterials*, 27: 2733-2737, 2006.
40. Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M, Lee MW. Comparison of drying methods in the fabrication of collagen scaffold via indirect rapid prototyping. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 82: 260-266, 2007.
41. Lopez-Heredia MA, Sohler J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29: 2608-2615, 2008.
42. Schumacher M, Uhl F, Detsch R, Deisinger U, Ziegler G. Static and dynamic cultivation of bone marrow stromal cells on biphasic calcium phosphate scaffolds derived from an indirect rapid prototyping technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21: 3039-3048, 2010.
43. Maurmann N, Pereira FDDS, Neto PI, Rezende RA, da Silva JV, Pranke P. Matrizes 3D de PCL cobertas por nanofibras de PLGA para a engenharia de tecidos. In: 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, Natal/RN. 2015.
44. Tirella A, Vozi F, Vozi G, Ahluwalia A. PAM2 (piston assisted microsyringe): a new rapid prototyping technique for biofabrication of cell incorporated scaffolds. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17: 229-237, 2010.

45. Martinez-Vazquez FJ, Cabanas MV, Paris JL, Lozano D, Vallet-Regi M. Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration. *Acta biomaterialia*, 15: 200-209, 2015.
46. Wang J, Wu D, Zhang Z, Li J, Shen Y, Wang Z, Li Y, Zhang ZY, Sun J. Biomimetically Ornamented Rapid Prototyping Fabrication of an Apatite–Collagen–Polycaprolactone Composite Construct with Nano–Micro–Macro Hierarchical Structure for Large Bone Defect Treatment. *ACS applied materials & interfaces*, 7: 26244-26256, 2015.
47. Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, 23: 4437-4447, 2002.
48. Hoque ME, Hutmacher DW, Feng W, Li S, Huang MH, Vert M, Wong YS. Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG-PCL-PLA scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16: 1595-1610, 2005.
49. Warnke PH, Douglas T, Wollny P, Sherry E, Steiner M, Galonska S, Becker ST, Springer IN, Wiltfang J, Sivananthan S. Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering. *Tissue engineering part c: Methods*, 15: 115-124, 2008.
50. Park SH, Park DS, Shin JW, Kang YG, Kim HK, Yoon TR, Shin JW. Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23: 2671-2678, 2012.
51. Hoque, ME. Robust formulation for the design of tissue engineering scaffolds: A comprehensive study on structural anisotropy, viscoelasticity and degradation of 3D scaffolds fabricated with customized desktop robot based rapid prototyping (DRBPR) system. *Materials Science and Engineering: C*, 72: 433-443, 2017.
52. Lee JW, Kim JY, Cho DW. Solid free-form fabrication technology and its application to bone tissue engineering. *International journal of stem cells*, 3: 85-95, 2010.
53. Arcaute K, Mann B, Wicker R. Stereolithography of spatially controlled multi-material bioactive poly (ethylene glycol) scaffolds. *Acta biomaterialia*, 6: 1047-1054, 2010.
54. Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74: 782-788, 2005.
55. Lu L, Zhang Q, Wootton D, Chiou R, Li D, Lu B, Lelkes P, Zhou J. Biocompatibility and biodegradation studies of PCL/ β -TCP bone tissue scaffold fabricated by structural porogen method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23: 2217-2226, 2012.

56. Tarafder S, Davies NM, Bandyopadhyay A, Bose S. 3D printed tricalcium phosphate scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on *in vivo* osteogenesis in a rat distal femoral defect model. *Biomaterials science*, 1: 1250-1259, 2013.
57. Tarafder S, Bose S. Polycaprolactone-coated 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering: *in vitro* alendronate release behavior and local delivery effect on *in vivo* osteogenesis. *ACS applied materials & interfaces*, 6: 9955-9965, 2014.
58. Qian C, Zhang F, Sun J. Fabrication of Ti/HA composite and functionally graded implant by three-dimensional printing. *Bio-medical materials and engineering*, 25: 127-136, 2015.
59. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, 16: 496-504, 2013.
60. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*, 35: 4026-4034, 2014.