



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“IN SITU BIOPRINTING: APPLICAZIONI ATTUALI E PROSPETTIVE  
FUTURE”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Anna Caleffi**

**ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022**

**Data di laurea: 14/03/2022**



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Scuola di Ingegneria  
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

## **In situ bioprinting: applicazioni attuali e prospettive future**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando/a: Anna Caleffi

Data: 14/03/2022

A.A. 2021/2022

Firma laureando

Firma relatore

## **Indice**

Abstract	pagina 3
Introduzione	pagina 4
Capitolo 1: Definizioni generali	pagina 6
1.1 Biofabrication	pagina 6
1.2 Bioprinting	pagina 7
1.3 Bioprinting in situ	pagina 8
1.3.1 Tipologie	pagina 9
1.3.2 Confronto tra bioprinting in vitro e bioprinting in situ	pagina 12
1.3.3 Biomateriali utilizzabili	pagina 13
Capitolo 2: Impiego di 3D bioprinting in Situ	pagina 16
2.1 Cute	pagina 16
2.2 Tessuto osseo	pagina 19
2.3 Tessuto cartilagineo	pagina 21
Capitolo 3: Sfide e prospettive future per il bioprinting in Situ	pagina 24
3.1 Biomateriali e maturazione dei tessuti	pagina 24
3.2 Costi	pagina 25
3.3 Questioni etiche e legislative	pagina 26
3.4 Prospettive future	pagina 27
3.4.1 Design del dispositivo e sviluppo di un software adeguato	pagina 27
3.4.2 Bioinks innovativi	pagina 27
3.4.3 Sistema di scansione adeguato	pagina 28
3.4.4 Integrazione di sensori di ispezione e sistema di controllo a feedback	pagina 28
3.4.5 Altre modalità di stampa	pagina 29
3.4.6 Sviluppo di un sistema di bioprinting multiasse	pagina 30
3.4.7 Sterilizzazione	pagine 30
Conclusioni	pagina 30
Bibliografia	pagina 32

## **Abstract**

Il bioprinting in situ, detto anche bioprinting in vivo, è una tecnologia emergente che prevede la stampa diretta di bioink nel sito anatomico del tessuto da ingegnerizzare. Il bioinchiostro utilizzato è un aggregato di cellule e biomateriali e, ad oggi, per tale tecnica vengono utilizzate 3 diverse tipologie di biostampanti: droplet-based bioprinting (DBB), extrusion-based bioprinting (EBB) e laser-based printing (LBB). L'utilizzo della tecnica di bioprinting in situ nel contesto clinico, attualmente, è considerato impegnativo, sia per la mancanza di competenze specifiche da parte di chirurghi, sia per i costi ancora molto elevati. Questo campo, tuttavia, si è sviluppato molto rapidamente negli ultimi anni e in letteratura sono presenti varie ricerche che ne hanno dimostrato il notevole potenziale, in particolare nella riparazione della cute, delle ossa e della cartilagine. In questo elaborato vengono presentati i principali studi che sono stati svolti in questi anni, evidenziandone le limitazioni attuali e ipotizzando le prospettive future.

## Introduzione

Gli ultimi decenni sono stati caratterizzati da numerosi progressi in campo scientifico e tecnologico, che hanno avuto ricadute importanti anche nell'ingegneria tissutale. La sostituzione, infatti, di tessuti e organi danneggiati da traumi o malattie rappresenta un problema rilevante che ha portato i ricercatori a optare per soluzioni innovative. Un esempio sono le ulcere diabetiche, ovvero delle lesioni cutanee molto frequenti nei pazienti diabetici che nel 21% dei casi portano all'amputazione dell'arto. Queste, infatti, non sono in grado di rimarginarsi autonomamente, bensì continuano ad espandersi.

In particolar modo, dagli inizi di questo secolo, l'attenzione dei ricercatori biomedici si è concentrata sul campo della "*biofabrication*". Questa viene definita come la creazione automatizzata di prodotti biologici funzionali con organizzazione strutturale partendo da cellule viventi, molecole bioattive, biomateriali, aggregati cellulari, attraverso il bioassemblaggio e successivi processi di maturazione dei tessuti. In quest'ambito una delle tecnologie più promettenti è il bioprinting in situ, ovvero la stampa diretta di bioinchiostro per creare o riparare tessuti viventi o organi danneggiati direttamente in ambiente biologico. Per questa tecnologia sono previste varie fasi: la prima prevede la definizione di un modello digitale ottenuto direttamente da tomografia computerizzata (CT, Computed Tomography) e risonanza magnetica (MRI, Magnetic Resonance Imaging) del paziente in esame. In seguito, mediante l'elaborazione delle immagini CAD (Computer-Aided Design), si ottiene il modello 3D da realizzare. Tramite specifici algoritmi, il modello digitale viene poi convertito in una serie di istruzioni necessarie per guidare i sistemi hardware. Per la realizzazione del costrutto desiderato tramite l'utilizzo di un braccio robotico. Questo permette di eseguire la stampa per fabbricare o riparare tessuti biologici e organi direttamente in sala operatoria con la massima somiglianza gerarchica e fisiologica possibile alle strutture native.

Per gli approcci di *tissue engineering* tradizionali si deve creare un microambiente artificiale in grado di migliorare la vitalità, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Il bioprinting in situ, invece, il microambiente necessario è rappresentato dal corpo umano. La presenza naturale dei fattori sopracitati, la semplicità, la facilità di manipolazione e i costi inferiori rendono questa tecnica più promettente per le applicazioni di *tissue engineering* rispetto agli approcci ex vivo. Allo stato attuale, l'impiego del bioprinting in situ è ancora in fase di sviluppo. Infatti, da una parte i chirurghi necessitano di essere adeguatamente formati per eseguire interventi di questo tipo, dall'altra servono ingenti investimenti per fare fronte ai costi di produzione. Nonostante ciò, questa tecnica ha fatto grandi progressi in questi ultimi anni e in letteratura sono presenti

numerosi studi che ne hanno dimostrato il reale potenziale, soprattutto per quanto riguarda la riparazione della cute, del tessuto osseo e della cartilagine. Inoltre, questa tecnica è attualmente la più promettente del settore grazie alla capacità di controllare con precisione sia la geometria da realizzare che la quantità di biomateriale utilizzato nella fabbricazione del tessuto. Ciononostante, esistono problemi tuttora irrisolti come, ad esempio, la vitalità delle cellule e la vascolarizzazione dei tessuti stampati. Sono anche presenti molti punti interrogativi per quanto riguarda alcune questioni etiche e legislative.

Questo elaborato è articolato in 3 capitoli: nel primo capitolo viene fornita un'introduzione generale riguardo al "*bioprinting*", partendo dalla definizione di "*biofabrication*" e arrivando a quella di bioprinting in situ, con particolare riferimento alle tipologie di biostampanti e ai biomateriali utilizzabili. Il secondo capitolo si concentra sull'impiego del bioprinting in situ in ambito clinico, proponendo alcuni studi per la sostituzione di cute, tessuto osseo e tessuto cartilagineo. Nel terzo capitolo, infine, vengono analizzate le sfide attuali e le prospettive future per l'applicazione di questa tecnica su larga scala.

# Capitolo 1. Definizioni Generali

## 1.1 Biofabrication

L'ingegneria tissutale (*tissue engineering*) fu definita dal Dott. Langer e dal Prof. Vacanti nel 1993 come una scienza che, applicando principi e metodi sia dell'ingegneria che della biologia, si pone l'obiettivo di sviluppare tessuti in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le loro funzioni nel caso in cui queste siano danneggiate. Ha quindi come scopo principale quello di fabbricare tessuti biologici (epiteliali, vascolari, nervosi, cartilaginei, etc.) da poter poi impiantare in sostituzione di quelli danneggiati o malfunzionanti [1].

La progettazione dei tessuti avviene mediante l'utilizzo di materiali, cellule, fattori biochimici e sistemi di coltura seguendo due diverse tecniche:

- *in vitro*: le cellule vengono espanse in coltura su apposite impalcature tridimensionali, dette scaffold, che sostengono l'architettura del tessuto. Viene creato un ambiente in grado di simulare condizioni ottimali per la crescita cellulare. Quando poi il processo è terminato, il tessuto viene impiantato nel paziente;
- *in vivo*: la rigenerazione cellulare avviene direttamente nel paziente. In questo caso, quindi, non c'è la necessità di seminare le cellule *in vitro* né di utilizzare un bioreattore, poiché lo diventa il corpo umano stesso [2].

Il campo della *biofabrication* è un settore dell'ingegneria tissutale molto recente, in rapida crescita e continua evoluzione. Il termine "*biofabrication*" è utilizzato in varie discipline, tra le quali l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa rappresentano quelle di maggior interesse. In particolare, fu introdotto nel 1994 per indicare la biomineralizzazione delle perle. Successivamente, nel 2003 la *US Defence Advanced Research Projects Agency* impiegò questo termine per descrivere i metodi utilizzati per creare strutture 3D ad alta risoluzione in grado di imitare meccanismi di crescita biologica [3].

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale, con l'uscita nel 2009 del primo numero della rivista *Biofabrication*, quest'ultima viene definita come la produzione di prodotti biologici di complessi viventi e non viventi provenienti da materie prime come cellule viventi, molecole, matrici extracellulari e biomateriali. Questa tecnica prevede l'unione di diverse discipline, tra le quali la biologia, l'ingegneria meccanica, mediante le tecniche di produzione additiva e l'elaborazione automatica di immagini CAD, e le scienze dei biomateriali (Figura 1.1) [4].

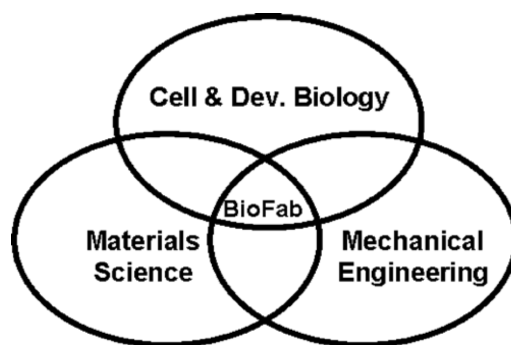


Figura 1.1: Le principali discipline che costituiscono la briofabrication: biologia cellulare e dello sviluppo, ingegneria meccanica e scienze dei biomateriali

Con il tempo la definizione si è evoluta e, ad oggi, quella maggiormente utilizzata è la seguente: “La creazione **automatizzata** di prodotti biologici funzionali con organizzazione strutturale partendo da cellule viventi, molecole bioattive, biomateriali, aggregati cellulari, attraverso il bioprinting o bioassemblaggio e successivi processi di maturazione dei tessuti” [3,5]. È quindi importante rimarcare il fatto che il processo debba essere automatizzato e avere finalità cliniche.

## 1.2 Bioprinting

Il bioprinting, detto anche biostampa tridimensionale, è una tecnologia che utilizza la stampa 3D per scopi clinici, arrivando alla produzione di organi e tessuti. Durante il primo workshop internazionale di bioprinting e biopatterring è stato definito come “l'utilizzo di processi di trasferimento di materiale per modellare e assemblare materiali biologicamente rilevanti, come molecole, cellule, tessuti e biomateriali biodegradabili, con un'organizzazione prescritta per realizzare una o più funzioni biologiche”<sup>1</sup> [6]. Rispetto a tecniche precedenti, questa è in grado di garantire un'elevata riproducibilità e un miglior controllo, grazie al sistema di deposizione automatizzato.

Il processo di realizzazione di 3D bioprinting è composto di varie fasi. Si inizia con la definizione di un modello digitale che può essere ottenuto direttamente da tomografia computerizzata (CT, Computed Tomography) e risonanza magnetica (MRI, Magnetic Resonance Imaging) del paziente in esame. Successivamente, mediante l'elaborazione automatica delle immagini CAD (Computer-Aided Design) si ottiene il modello 3D da realizzare. Tramite specifici algoritmi, il modello digitale viene poi convertito in una serie di istruzioni necessarie per guidare i sistemi hardware. Successivamente, il sistema di controllo

---

<sup>1</sup> Traduzione letterale dall'inglese



guida i componenti hardware per la realizzazione fisica del costrutto desiderato. Si è quindi in grado di formare tessuti ingegnerizzati grazie alla sovrapposizione di diversi strati (layer) spazialmente modellati di cellule, le quali andranno a costituire il tessuto specializzato [7].

La biostampa ha quindi come obiettivo quello di creare tessuto 3D grazie a strutture pre-programmate utilizzando un bioinchiostro (*bioink*), ovvero un aggregato di cellule e biomateriali. Quest'ultimo rappresenta un componente essenziale della biostampa e può essere reticolato o stabilizzato durante o subito dopo il processo per creare le forme finali dei costrutti tissutali previsti. La scelta del bioink è fatta in base all'applicazione, ovvero al tipo tessuto che si andrà ad ingegnerizzare, e alla tipologia di bioprinter utilizzato. Inoltre, deve possedere delle specifiche caratteristiche fisico-chimiche, come proprietà meccaniche, reologiche e chimiche adeguate [8].

Durante il processo, il bioink viene stampato "layer-by-layer" in modo alternato in concomitanza con la biocarta. Il dispositivo che eroga il bioink è detto bioprinter ed è in grado di depositare l'inchiostro solamente dove e quando indicato dal computer, in modo tale da essere il più fedeli possibili al modello creato, come viene mostrato in Figura 1.2. Il bioreattore, infine, è l'ambiente in cui far maturare e crescere i costrutti. [6]

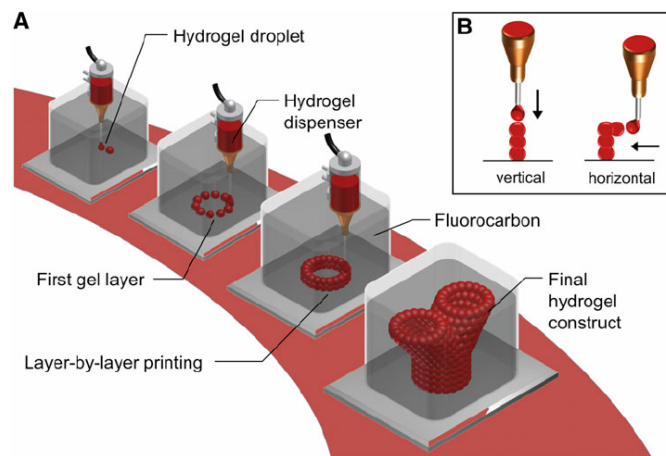


Figura 1.2: Processo di realizzazione layer-by-layer di tessuto ingegnerizzato.

Il bioprinting, quindi, ha come scopo quello di produrre una struttura o un tessuto ingegnerizzato da poter impiegare direttamente sull'uomo per riparare o sostituire i tessuti danneggiati o come materiale su cui poter eseguire test e studi farmacologici [9].

### 1.3 Bioprinting in situ

Il Bioprinting in situ, detto anche bioprinting in vivo, è la stampa diretta di bioink per creare o riparare tessuti viventi o organi danneggiati direttamente in ambiente biologico.

L'idea di bioprinting in vivo fu proposta per la prima volta nel 2007 utilizzando una tecnologia inkjet. Questa tecnica permette di riparare e ricostruire il tessuto danneggiato, anche se questo presenta geometrie particolari o superfici curve. Le tecniche di stampa 3D convenzionali, invece, sono solitamente limitate ad un substrato piano.

Come descritto in Figura 1.3, con il tempo la definizione e la tecnica di bioprinting in situ si è evoluta fino ad arrivare a quella odierna. In particolare, la Figura 1.3C evidenzia gli aspetti più innovativi e all'avanguardia di questa tecnica, come l'utilizzo di nuove tipologie di bioink, quello dell'intelligenza artificiale, sistemi di scansione 3D ad alta definizione, la possibilità di stampare su superfici curve e dinamiche e, tramite l'utilizzo di sensori, la possibilità di ricevere riscontri in tempo reale.

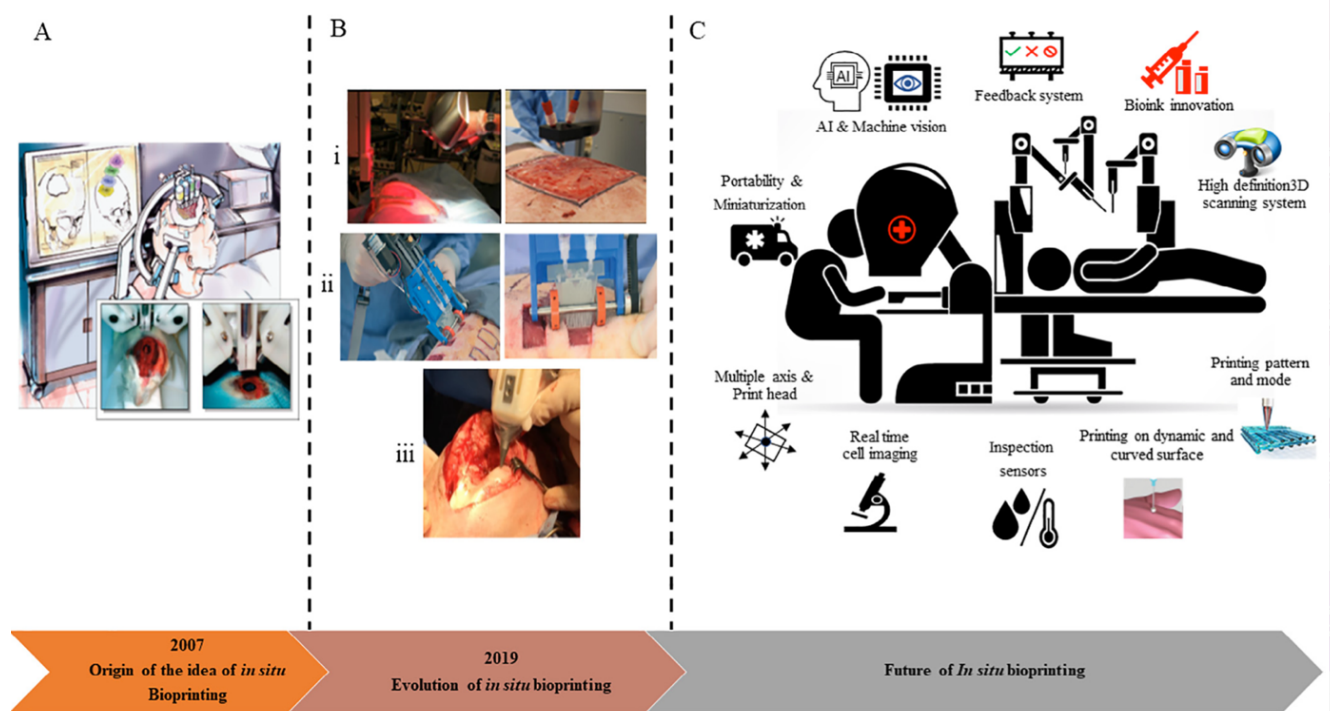


Figura 1.3: evoluzione di bioprinting in situ.

L'utilizzo della tecnica di bioprinting in situ nel contesto clinico, attualmente, è considerato impegnativo, sia per la mancanza di competenze richieste da parte di chirurghi, sia per i costi molto elevati. Quindi ci si dirige verso soluzioni standard, come, ad esempio, l'impianto di un costruito prefabbricato nel sito danneggiato [9].

Tuttavia, il campo si è sviluppato molto rapidamente negli ultimi anni e in letteratura sono presenti vari studi che hanno dimostrato l'immenso potenziale di questo approccio, in particolare nella riparazione della cute, delle ossa e della cartilagine. Inoltre, questa tecnica è

attualmente la più promettente del settore, grazie alla capacità di controllare con precisione sia la geometria da realizzare che la quantità di biomateriale utilizzato nella fabbricazione del tessuto. Ciononostante, esistono problemi tuttora irrisolti come, ad esempio, la vitalità delle cellule e la vascolarizzazione dei tessuti stampati [7].

Il bioprinting in vivo prevede l'utilizzo di un braccio robotico, che presenta un'unità di bioprinting mobile a 3 assi. Questo permette di eseguire la stampa in tempo reale per fabbricare o riparare tessuti biologici e organi con la massima somiglianza gerarchica e fisiologica possibile alle strutture native. La procedura deve comunque essere eseguita sotto il controllo di un chirurgo che, utilizzando una console di comando, può intervenire in tempo reale per sopperire a possibili complicazioni o per apportare modifiche alla procedura predefinita.

Questa tecnologia, attraverso la progettazione assistita da computer (CAD) e/o la produzione assistita da computer (CAM), sfrutta l'acquisizione di un progetto prestampato predefinendo le geometrie tridimensionali. Il CAD di un progetto digitale definisce l'architettura dei tessuti regolando il sistema di erogazione per controllare la posizione spaziale di tutti i componenti dei tessuti (cellule, biomateriali e fattori di crescita). Ad oggi sono già stati effettuati diversi studi su soggetti non umani per verificare l'applicabilità clinica di questa tecnologia. Il dispositivo può contenere una o più testine di stampa e diversi bioinks e soluzioni di reticolazione. L'assemblaggio del dispositivo differisce in base al tipo di unità di stampa, ovvero getto d'inchiostro, estrusione e stampa basata su laser. La fabbricazione della struttura 3D mediante una precisa deposizione spaziale del materiale è controllata utilizzando un software dedicato [9].

### *1.3.1 Tipologie*

Attualmente, le modalità di bioprinting possono essere divise in tre categorie: droplet-based bioprinting (DBB), extrusion-based bioprinting (EBB) e laser-based bioprinting (LBB). Ogni sistema presenta sia aspetti positivi che negativi per cui si sceglie quale metodologia utilizzare in base alla specifica funzione che il tessuto andrà a svolgere.

Nel metodo droplet-based il bioinchiostro nei terreni di coltura viene depositato sotto forma di goccioline in una posizione predefinita. Queste possono essere generate da forze termiche o acustiche. Infatti, questa tecnica comprende anche il getto d'inchiostro (ink-jet), l'espulsione acustica delle gocce (acoustic-droplet-ejection) e il bioprinting con microvalvole (microvalve bioprinting). Il DBB assicura generalmente una buona vitalità cellulare (80- 90%) con alta velocità e alta risoluzione. Per la riuscita della stampa, questo metodo richiede un bioinchiostro con bassa viscosità, biodegradabilità e biocompatibilità adeguate, buone proprietà adesive ed

elevata resistenza meccanica. Tuttavia, tali caratteristiche limitano la gamma di biomateriali utilizzabili per DBB. Pertanto, è disponibile come bioink per questa tecnica solamente una limitata gamma di idrogel. Nella maggior parte dei casi viene accompagnata da un'ulteriore fase di reticolazione. Questa tecnica di biostampa offre grandi vantaggi, grazie alla sua semplicità e versatilità con un grande controllo sulla deposizione. Sebbene la tecnologia consenta la fabbricazione di costrutti di tessuto eterocellulare in modo riproducibile e sia stata ampiamente utilizzata in diversi campi, deve far fronte anche ad alcuni limiti. Infatti, i tessuti biostampati presentano scarse proprietà strutturali e meccaniche, mancanza di vascolarizzazione e perfusibilità. Inoltre, durante la stampa, si possono avere altri problemi che includono: dimensioni delle gocce non uniformi, bassa direzionalità delle gocce e frequenti ostruzioni degli ugelli durante la stampa di bioinchiostri ad alta densità [10].

Per quanto riguarda la stampa extrusion-based, essa è una combinazione di un sistema di erogazione di fluidi, di un sistema robotico automatizzato per l'estrusione e di bioprinting. Durante la stampa, il bioink viene erogato da un sistema di deposizione, sotto il controllo di un computer, con conseguente deposizione precisa di cellule incapsulate in filamenti cilindrici 3D progettati in base al tipo di cellula. Questa tecnica di fabbricazione rapida fornisce una migliore integrità strutturale grazie alla continua deposizione di filamenti. Anche questo metodo di stampa permette di utilizzare un software per computer come il software CAD, che consente agli utenti di caricare un file di questo tipo per stampare automaticamente la struttura.

Il sistema di erogazione del fluido può essere azionato da un sistema pneumatico, meccanico (a pistone o a vite) o a solenoide, come mostrato in Figura 1.4. Il sistema a base pneumatica (*pneumatic micro-extrusion*) utilizza aria pressurizzata, mentre il sistema di microestrusione meccanica (*mechanical micro-extrusion*) utilizza un pistone. La microestrusione a solenoide (*solenoid micro-extrusion*) utilizza impulsi elettrici per aprire una valvola, annullando la forza di attrazione magnetica generata tra uno stantuffo ferromagnetico flottante e un magnete ad anello ferromagnetico. Nonostante i grandi vantaggi, come la possibilità di utilizzare un'ampia gamma di bioinchiostri e la capacità di biostampare costrutti di tessuto meccanicamente resistenti, la tecnologia attualmente deve fare i conti con diverse limitazioni, in particolare: la risoluzione di stampa, la capacità di definire forme anatomicamente corrette e quella di generare costrutti tissutali in scala [11][12].

Infine, la tecnologia laser-based bioprinting è una metodologia emergente in grado di incanalare più cellule in un raggio laser e depositarle sotto forma di flusso costante su superfici non assorbenti, inclusi gel biologici. Ha una precisione di scala micrometrica ed è attualmente l'unica tecnica in grado di modellare le cellule su gel biologici in tre dimensioni. È vantaggiosa

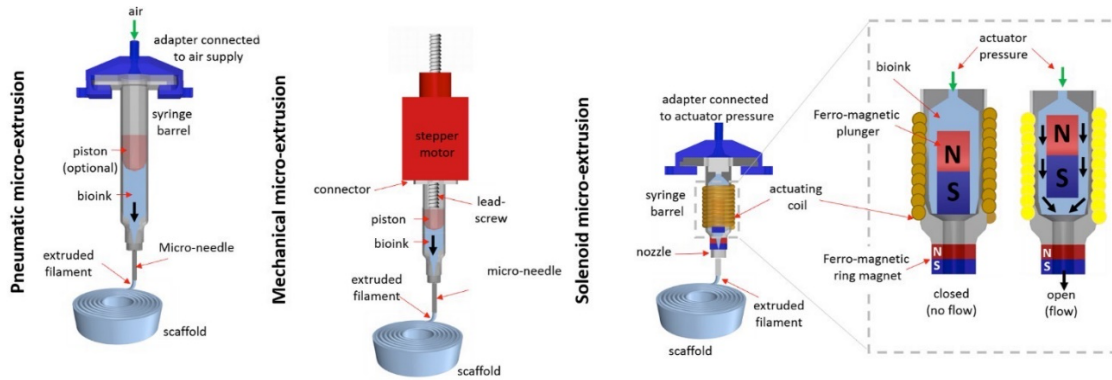


Figura 1.4: metodologie di stampa extrusion-based. Sistema pneumatico di micro-extrusion (sinistra); sistema meccanico (centro); sistema a solenoide (destra).

rispetto alle modalità di stampa citate sopra in quanto la stampante è priva di ugelli che possono compromettere la sopravvivenza cellulare [13].

La modalità di stampa per il bioprinting in situ viene scelta in base al tessuto o organo che si intende stampare, che dovrà avere vitalità cellulare e risoluzione sufficienti. Anche il tempo necessario per il processo di stampa è un parametro importante da tenere in considerazione, poiché le biostampanti con velocità molto basse potrebbero rendere impossibile l'applicazione del processo in ambito clinico [8,9].

### 1.3.2 Confronto tra bioprinting in vitro e bioprinting in situ

Attualmente, il metodo più comune per fabbricare tessuti da impiantare prevede la coltura di cellule su scaffold tridimensionali in vitro. Si è dimostrato che, utilizzando tecniche di bioprinting per la fabbricazione di scaffold, si ottengono buoni risultati utilizzando diversi biomateriali e cellule. Tuttavia, la biostampa di scaffold 3D in vitro può avere diverse limitazioni intrinseche per quanto concerne l'applicabilità in ambito clinico. In primo luogo, i progressi per creare un tessuto o un organo funzionale in vitro per la sostituzione di un tessuto o un organo danneggiato risultano ancora troppo precoci e necessitano di maggiori studi. In secondo luogo, il costruito 3D è fragile a causa della insufficiente resistenza meccanica. Infatti, la manipolazione e l'impianto dei costrutti ingegnerizzati nel corpo è molto impegnativo a causa di: problemi nelle micro e macro-architetture (come rigonfiamento, contrazione o deformazione) del costruito sostitutivo, compromissione dell'integrità strutturale, rischio di contaminazione dovuto al trasporto e all'impianto manuale, vulnerabilità dei tessuti nativi vicini, necessità di un ambiente altamente sterile e basso tasso di replica. In terzo luogo, la morfologia del costruito creato può differire dalla dimensione effettiva del sito danneggiato a

causa della risoluzione limitata delle scansioni di tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (MRI) [9, 14].

L'approccio in situ è vantaggioso in quanto elimina la creazione del microambiente artificiale. In confronto, gli approcci ex vivo richiedono prevalentemente la realizzazione del microambiente tissutale nativo (ovvero, i necessari segnali biochimici e biofisici) per una migliore vitalità cellulare, proliferazione, differenziazione e migrazione, che sono necessarie per sviluppare un tessuto o un organo funzionale. La presenza naturale di questi fattori, la semplicità, la facilità di manipolazione e i costi inferiori degli approcci in situ rendono questa tecnica più promettente per le applicazioni di tissue engineering rispetto agli approcci ex vivo [2, 15].

Gli approcci di bioprinting in situ coinvolgono bracci robotici o dispositivi portatili assemblati con un'unità di bioprinting separata, che entra nel corpo attraverso accessi poco invasivi e ricostruisce la parte danneggiata con un costrutto che sia equivalente al tessuto nativo dal punto di vista anatomico e funzionale, sotto il controllo di un chirurgo. Tramite questa tecnica, il corpo umano funziona come un "bioreattore in vivo" che governa lo sviluppo e la maturazione del costrutto stampato. Tuttavia, è importante immobilizzare in sicurezza l'organo ricevente durante il processo di stampa; infatti, piccoli movimenti durante la stampa possono comprometterne la buona riuscita di questa. Ad oggi, sono stati applicati approcci in situ per pelle, ossa e cartilagine anche se finora nessuna stampante in situ è stata commercializzata per l'utilizzo clinico. Tuttavia, è interessante notare che sono pochi i sistemi chirurgici robot-assistiti disponibili in commercio, ma che questi abbiano già dimostrato efficacia nell'eseguire l'intervento chirurgico molto più facilmente, con ripetibilità e accuratezza. Inoltre, nella sua fase iniziale, il bioprinting in situ potrebbe non sostituire gli approcci di ingegneria tissutale convenzionali, ma sicuramente sarà in grado di completarli [9].

### *1.3.3 Biomateriali utilizzabili*

I materiali adatti per il bioprinting in situ includono sia quelli sintetici che quelli di origine naturale. Tuttavia, questi biomateriali devono possedere due importanti proprietà: essere biodegradabili e suscitare una risposta proinfiammatoria minima. Per soddisfare quest'ultimo requisito si utilizzano alcune strategie, tra cui la modulazione della superficie dei biomateriali, la funzionalizzazione delle superfici con molecole immunomodulatorie e la manipolazione delle proprietà dei materiali, come la dimensione dei pori e la rigidità per influenzare il comportamento cellulare. Tali tecniche si applicano tipicamente ai materiali polimerici sintetici, che altrimenti inevitabilmente susciterebbero una risposta pro-infiammatoria.

Un concetto fondamentale dell'ingegneria tissutale in situ implica l'induzione di processi biologici in vivo diretti alla formazione di tessuti funzionali strutturalmente e funzionalmente appropriati per il sito anatomico previsto e l'applicazione clinica [9, 15].

I biomateriali che possono fornire un microambiente favorevole per le tecniche di ingegneria tissutale in situ includono materiali sintetici, biologici e ibridi [8].

I primi sono comunemente usati nella pratica medica e sono prodotti da una varietà di materiali, come acciaio inossidabile, polipropilene, silicone e poliuretani. I biomateriali sintetici possono essere prodotti con alta precisione e possono essere sterilizzati e confezionati una volta ultimati con metodi sicuri. Uno dei vantaggi dell'uso di materiali sintetici per tecniche di tissue engineering in situ è la capacità di fabbricare lo scaffold "su misura", cioè in grado di adattarsi perfettamente all'anatomia del sito di destinazione. Tuttavia, uno svantaggio dei materiali sintetici è l'inevitabile risposta proinfiammatoria che promuove la deposizione di tessuto cicatriziale e interferisce con l'autoassemblaggio cellulare. Il tasso di degradazione del biomateriale è un fattore determinante per l'esito della procedura. Più a lungo è presente il materiale (estraneo), maggiore è l'impatto della reazione infiammatoria associata. Un esempio di biomateriali sintetici utilizzati per l'ingegneria tissutale in situ è l'utilizzo di innesti di policaprolattone elettrofilato riassorbibili per creare vasi sanguigni di piccolo diametro [15].

I materiali naturali sono composti da prodotti secreti delle cellule, compresa la matrice extracellulare (ECM) o singoli componenti dell'ECM, come il collagene. Ad esempio, i materiali ECM bioscaffold, composti da matrice della vescica urinaria (UBM) e sottomucosa intestinale (SIS), sono prodotti dalla decellularizzazione del tessuto di origine. Questi materiali spesso mantengono una bioattività sufficiente per promuovere effetti di rimodellamento positivi.

Per sfruttare al meglio le qualità dei sia dei materiali sintetici che biologici, sono stati utilizzati materiali ibridi per l'uso in situ. Ad esempio, la precisione nella fabbricazione degli scaffold prodotti da biomateriali sintetici può essere combinata con la biocompatibilità dei materiali naturali. Si può quindi concludere dicendo che, secondo le indagini svolte, i biomateriali che ad oggi risultano essere più soddisfacenti sono quelli ibridi, che utilizzano biomateriali combinati con cellule e/o molecole bioattive [15].

Anche il concetto di bioinchiostro (bioink) è fondamentale nel campo biostampa. Questi sono formati da biomateriali e cellule viventi e sono in grado di imitare un ambiente a matrice extracellulare per supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule viventi. Rispetto ai tradizionali materiali di stampa 3D, i bioinchiostri devono avere componenti bioattivi non tossici e una temperatura di stampa inferiore alle temperature fisiologiche.

Vengono utilizzati sia polimeri naturali che sintetici. I polimeri sintetici comprendono policaprolattone (PCL), pluronico, polivinilpirrolidone (PVP), polietilenglicole (PEG), mentre i polimeri naturali sono gelatina, acido ialuronico, collagene e matrigel [16].



## Capitolo 2. Impiego di 3D bioprinting in situ

### 2.1 Cute

La cute è un tessuto complesso, costituito da diversi tipi di cellule e strutture funzionali, come vasi sanguigni e ghiandole sudoripare. È composta da due strati principali, l'epidermide e il derma. Questi si trovano sopra uno strato adiposo, detto ipoderma. A loro volta, l'epidermide e il derma sono composti da sotto-strati. L'area compresa tra l'epidermide e il derma è detta giunzione dermo-epidermica ed è responsabile dello scambio di nutrienti, ossigeno e prodotti di scarto tra il derma vascolarizzato e l'epidermide non vascolarizzata.

Essendo l'organo del corpo umano più esteso e trovandosi in superficie, la cute risulta essere ideale per testare il bioprinting 3D in situ. Infatti, utilizzando questa tecnica, sono state portate avanti molte ricerche mirate a ricreare il tessuto cutaneo, le quali hanno ottenuto dei buoni risultati in quanto hanno migliorato il recupero e/o la crescita della pelle sia in vitro che in vivo. Tuttavia, bisogna tenere in considerazione alcune limitazioni che, ad oggi, non sono ancora state risolte, come la morbilità del paziente, la bassa aderenza al tessuto nativo circostante e l'alto costo di fabbricazione.

Le lesioni cutanee, come ad esempio le ulcere diabetiche e le ustioni, rappresentano una problematica molto diffusa, che causa grande disagio nei pazienti che ne sono affetti e per la quale si sta cercando di trovare nuove soluzioni che possano rendere il trattamento più rapido ed efficace [7].

Le tecniche di fabbricazione di tessuto cutaneo utilizzano le cellule, lo scaffold, che funge da supporto e i fattori di crescita, che consentono una corretta differenziazione tra le cellule e la loro funzionalizzazione. Le tecniche di 3D bioprinting per la fabbricazione di costrutti cutanei portano con sé alcuni importanti vantaggi rispetto ad altre strategie convenzionali di ingegneria tissutale, tra i quali l'automazione e la standardizzazione per le applicazioni cliniche e la precisione nella deposizione delle cellule. Sebbene le strategie convenzionali di ingegneria tissutale (cioè la coltura di cellule su uno scaffold e la maturazione in un bioreattore) e il bioprinting attualmente ottengano risultati simili, per quanto riguarda il secondo ci sono ancora molti aspetti che richiedono miglioramenti nel processo di produzione della pelle, compresi, come nel caso delle ustioni, i lunghi tempi di produzione per ottenere grandi superfici necessarie a coprire l'intera ferita.

Come specificato nel primo capitolo, esistono due differenti metodi per applicare le tecniche di 3D bioprinting: bioprinting in vitro e bioprinting in situ. Questi due approcci sono molto simili, fatta eccezione per il sito di stampa e la maturazione dei tessuti. Per quanto riguarda il

bioprinting in vitro, la stampa viene eseguita in vitro e la pelle biostampata viene lasciata maturare in un bioreattore, dopodiché viene trapiantata nel sito della ferita. La biostampa in situ, invece, comporta la stampa diretta di cellule pre-coltivate sul sito della lesione per la chiusura della ferita, consentendo la maturazione della pelle compromessa della ferita. L'uso della biostampa in situ per la ricostruzione della pelle offre numerosi vantaggi, tra cui la precisa deposizione di cellule sul sito di interesse e la possibilità di evitare una differenziazione in vitro costosa e dispendiosa in termini di tempo [17].

La stampa tramite 3D bioprinting della cute si svolge in vari passaggi. Il primo passo consiste nel preparare il bioink, che svolge un ruolo chiave nel processo. Durante la stampa questo entra in contatto diretto con le cellule, mantenendole attive e fornendo un microambiente di supporto per la maturazione del tessuto cutaneo. Pertanto, un bioinchiostro ideale dovrebbe avere le seguenti proprietà: una buona adattabilità alla stampa, un'elevata biocompatibilità, una stabilità meccanica ottimale, una efficace biodegradabilità, che possano simulare il microambiente in vivo di tipi cellulari specifici e supportare e promuovere attività cellulari come adesione, migrazione, proliferazione e differenziazione (Figura 2.1).

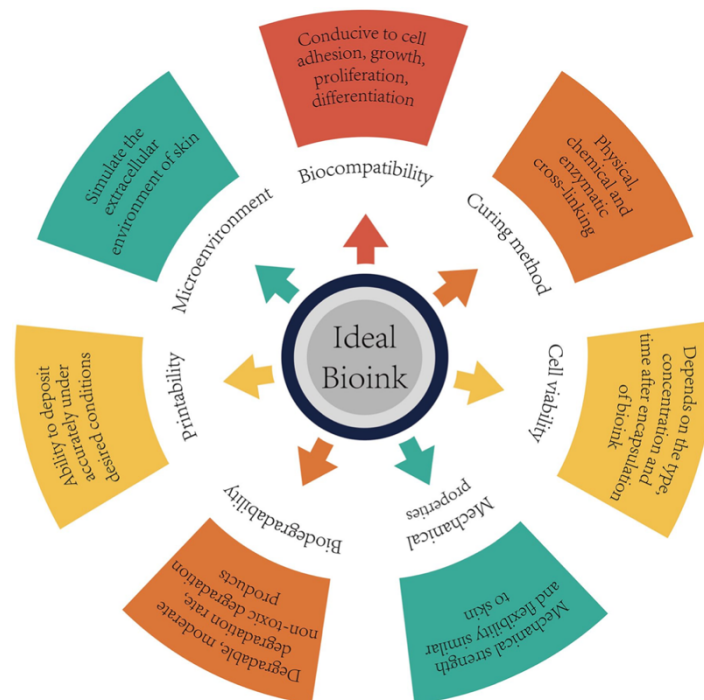


Figura 2.1: Caratteristiche ideali del bioink per creare innesti cutanei.

Il secondo passo è la stampa accurata dei sostituti della pelle ottenuti in base alle esigenze specifiche del singolo paziente. I sostituti cutanei stampati possono essere innestati direttamente

sulla superficie della ferita o dopo coltura in vitro. Il materiale dello scaffold viene gradualmente degradato e assorbito nel corpo mentre le cellule impiantate proliferano, secernendo matrice extra-cellulare e sostituendo infine lo scaffold biologico assorbito, completando la rigenerazione del tessuto cutaneo e ottenendo la riparazione delle ferite cutanee. I problemi più comuni per la fabbricazione di tessuto cutaneo tramite tecniche di 3D bioprinting sono: la vascolarizzazione della pelle, la pigmentazione e la congiunzione con le appendici cutanee, come le ghiandole sudoripare e i follicoli piliferi.

Poiché le tecniche di bioprinting in situ sono piuttosto recenti, gli studi sono ancora limitati e in fase di sviluppo. Tuttavia, un esperimento interessante è stato portato avanti dal dottor Kyle Binder nel 2010. Egli ha utilizzato la tecnologia di biostampa a ink-jet per stampare direttamente cheratinociti (cellule dell'epidermide, KC) e fibroblasti sulle ferite ( $3,0 \times 2,5 \text{ cm}^2$ ) presenti sul dorso di topi. Innanzitutto, sulle ferite sono stati stampati i fibroblasti ( $1,0 \times 10^5$  cellule/ $\text{cm}^2$ ) incorporati in idrogel di fibrinogeno/collagene, seguito da uno strato di KC ( $1,0 \times 10^7$  cellule/ $\text{cm}^2$ ) sopra lo strato di fibroblasti. Dopo 8 settimane, è stata osservata la guarigione della ferita e la completa riepitelizzazione [18].

Tra gli studi in corso, il più promettente è sicuramente quello del professor Mironov, che ha presentato i risultati preliminari del suo lavoro durante un suo intervento alla XL Scuola Annuale del Gruppo Nazionale di Bioingegneria (GNB) dal titolo: "In situ Bioprinting". Durante la conferenza sono state esposte le fasi principali dello studio, che ha come obiettivo quello di riparare un difetto cutaneo artificiale in un maialino nano. Come robot chirurgico è stato utilizzato il Kuka, sviluppato dall'omonima azienda tedesca che ha incorporato una siringa automatizzata prodotta da un gruppo di ricerca statunitense. Il meccanismo è basato sull'estrusione di bioinchiostro composto da collagene e diversi tipi di cellule. In Figura 2.2 è possibile vedere il processo di stampa (A) e il risultato finale (B). Dopo l'intervento, è stato applicato un dispositivo chiamato "exudate sucking device" (Figura 2.2 C), in grado di assorbire l'eventuale essudato che il corpo espelle ed evitare l'insorgere di infezioni. La fedeltà di stampa è molto buona e in 4 settimane il tessuto risulta completamente guarito. Tuttavia, non vi è un vero e proprio vantaggio in termini di tempo rispetto alle tecniche di ingegneria tissutale convenzionali. Questo, secondo il professor Mironov, è dovuto alla scelta sbagliata del target. Infatti, la scelta sarebbe dovuta ricadere su pelle già danneggiata da una malattia. L'esempio più promettente e che riguarda un cospicuo numero di pazienti (500 milioni), sono le ulcere diabetiche che nel 21% dei casi portano all'amputazione di un arto. Le lesioni della cute causate dalle ulcere diabetiche non si rimarginano autonomamente, bensì continuano ad espandersi. Per

questo, intervenire prontamente con la tecnica del bioprining in situ, potrebbe rappresentare una soluzione innovativa per questo tipo di malattia.

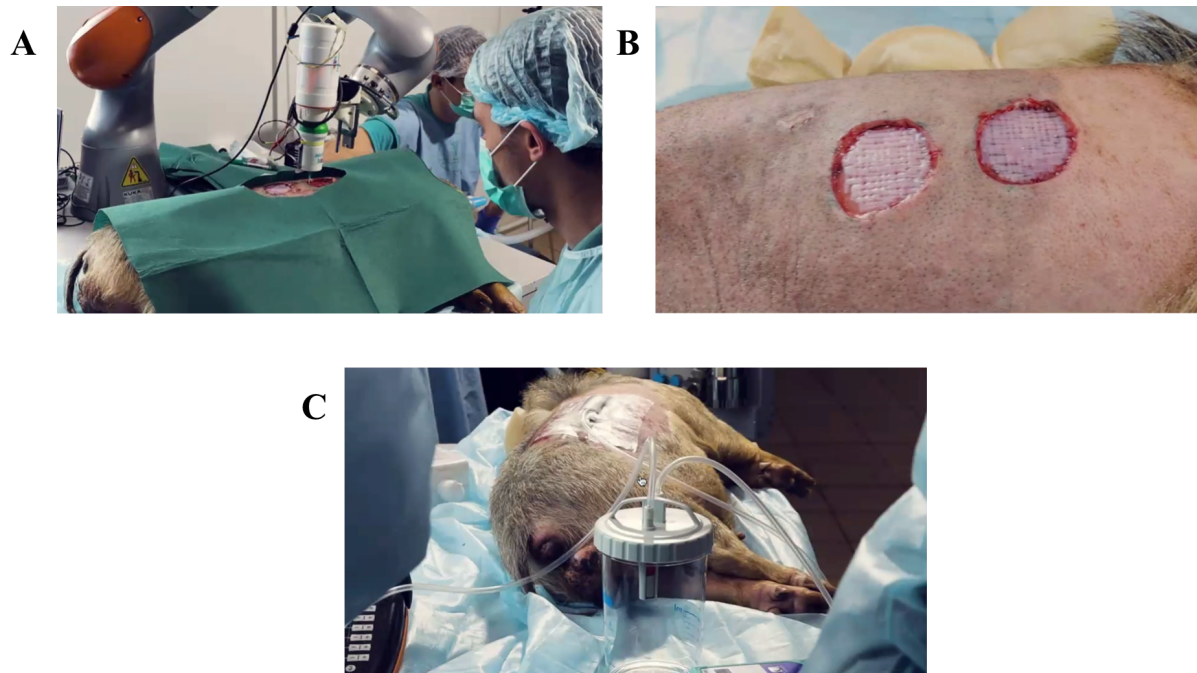


Figura 2.2: Processo di stampa. Nella prima figura (A) è possibile vedere il robot chirurgico Kuka, che stampa gli strati di collagene e cellule. Nella seconda (B) si nota il risultato al termine dell'operazione chirurgica. Infine, nell'ultima (C) si vede il dispositivo “*exudate sucking device*” che ha il compito di aspirare i fluidi che il corpo espelle.

## 2.2 Tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato per la funzione di sostegno. È costituito da una matrice extracellulare molto dura, mineralizzata, e da una componente di cellule, dette osteociti. La matrice, ricca di calcio, forma una complessa rete tridimensionale che racchiude all'interno di piccole lacune le stesse cellule che l'hanno prodotta. Ha ottime proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo costituisce un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Da un punto di vista macroscopico, si distinguono due varietà di osso: l'osso spugnoso e l'osso compatto. L'osso spugnoso lo si ritrova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe. Appare conformato come una spugna, con travate ossee, dette trabecole, variamente orientate e intersecate tra loro e delimitanti cavità, dette cavità midollari, che in vivo sono ripiene di midollo osseo ematopoietico. L'osso compatto lo si ritrova

a formare la porzione più superficiale delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle ossa lunghe, nonché a costituire la diafisi di queste ultime. Esso è privo di cavità macroscopicamente evidenti [19].

I difetti ossei possono essere provocati da traumi o malattie, queste ultime possono essere acquisite o congenite. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati vari composti ceramici che utilizzano idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ), beta-tricalcio fosfato ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e cementi al fosfato di calcio al fine di supportare il ripristino dei difetti ossei. Questi approcci convenzionali sono utilizzati ancora oggi e forniscono risultati positivi, poiché soddisfano le caratteristiche strutturali macroscopiche e le proprietà meccaniche richieste per i sostituti ossei. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, non viene osservata una corretta osteointegrazione, richiedendo interventi chirurgici di ripetizione nel corso del tempo, in particolare se il primo intervento viene svolto in età evolutiva. Questa tecnica, quindi, non fornisce un trattamento permanente.

Le tecniche di ingegneria tissutale per la fabbricazione di tessuto osseo hanno come obiettivo quello di costruire un tessuto che possa essere incorporato nel difetto osseo e crescere con il paziente, fornendo così una soluzione che possa durare nel tempo. La sfida, inoltre, prevede di costruire un tessuto ingegnerizzato con proprietà meccaniche pari a quelle del tessuto osseo nativo. In particolare, la struttura deve avere ottime caratteristiche di resistenza e durezza ed essere porosa, al fine di consentire la vascolarizzazione e la proliferazione cellulare [19].

Gli studi sul bioprinting 3D per costruire il tessuto osseo sono stati condotti utilizzando due diversi approcci: il primo sfrutta una struttura ibrida creata combinando un biomateriale con una soluzione di diversi tipi di cellule, il secondo impiega solo singole cellule dello stesso tipo in aggiunta al biomateriale [9].

Nel 2010, la professoressa Keriquel e il suo gruppo di studio hanno eseguito delle ricerche in vivo utilizzando il bioprinting per assistere la riparazione ossea [20]. Prima di questo, però hanno applicato delle tecniche simili al bioprinting in situ, ma che non rientrano in tale definizione, poiché il bioink utilizzato comprende solo biomateriali. L'indagine è stata eseguita su cavie con un difetto cranico. È stata utilizzata la biostampa laser assistita a 5 assi per riparare un difetto osseo di 4 mm, depositando 30 strati sovrapposti (20  $\mu\text{m}$  ciascuno) di nanoidrossiapatite (n-HA). I risultati della microtomografia a raggi X hanno rivelato che i difetti trattati sono stati completamente recuperati (29 cavie su 30) in un periodo di 3 mesi. Inoltre, la risonanza magnetica non ha evidenziato la presenza di infiammazione sulla dura madre delle cavie. Ricerche successive di bioprinting in situ eseguite dallo stesso gruppo, hanno dimostrato che la stampa di cellule stromali mesenchimali incapsulate con nano-idrossiapatite e collagene, sono in grado di migliorare la rigenerazione ossea. Infatti, nella zona in cui queste cellule sono

state innestate, è stata osservata un'importante formazione di osso maturo rispetto alla zona non trattata. Questi studi, inoltre, hanno esplorato l'applicabilità del laser nella biostampa in vivo senza riscontrare danni ai tessuti [22].

### **2.3 Tessuto cartilagineo**

La cartilagine articolare è un tessuto connettivo specializzato con funzione di sostegno ed è dotato di notevole resistenza alla pressione e alla trazione. Riveste le estremità delle ossa e le protegge dall'attrito che si verrebbe a creare tra le varie parti dello scheletro. È un tessuto avascolare e aneurale, quindi al suo interno non presenta vasi sanguigni e non è innervato. Questa caratteristica comporta il fatto che l'essere umano non sia in grado di percepire le prime fasi del danneggiamento. Inoltre, la cartilagine mostra scarse capacità rigenerative in caso di lesione. Anche quando questa si rigenera, dà comunque origine ad un tessuto di tipo fibrocartilagineo, meno resistente ed elastico dell'originale; può quindi compromettere la funzionalità dell'articolazione e favorire nel tempo l'instaurarsi di fenomeni degenerativi [23].

L'artrosi è la malattia articolare cronica degenerativa più comune, che porta all'infiammazione e alla degradazione della cartilagine articolare. I trattamenti che attualmente si utilizzano per i difetti condrali includono: impianto di condrociti autologhi, mosaicoplastica e innesti di pericondrio. Tuttavia, gli studi clinici non sono riusciti a mostrare una riproduzione affidabile del tessuto cartilagineo ialino e, ad oggi, si è potuto riscontrare che nessuna delle soluzioni proposte risulta ottimale per il trattamento delle lesioni condrali. Inoltre, a lungo termine queste soluzioni non sono state valutate sufficienti [9].

Per questo motivo, si è pensato di utilizzare i principi dell'ingegneria tissutale al fine di trattare le lesioni cartilaginee. Per quanto il tessuto sia biologicamente semplice, esso possiede una particolare struttura che non è facile da replicare in laboratorio. Le prime ricerche prevedevano l'iniezione di condrociti e cellule staminali mesenchimali nelle regioni danneggiate. Tuttavia, queste non hanno portato risultati soddisfacenti a causa dell'assenza di una struttura in grado di supportare le cellule. Successivamente, quindi, è stato introdotto lo scaffold [22].

Nel 2016, uno studio del ARC Centre of Excellence for Electromaterials Science della University of Wollongong in Australia, ha presentato un nuovo approccio in situ, che comporta l'utilizzo di uno strumento denominato "*bio-pen*", che, impiegando la tecnica di deposizione pneumatica, è in grado di depositare cellule e biomateriali direttamente nel sito anatomico (Figura 2.3) [23]. Nonostante questa tecnica non sia automatizzata e non rientri quindi propriamente nel campo del bioprinting in situ, è importante comunque soffermarsi su questa

nuova procedura, poiché rappresenta un vero punto di svolta in quest'ambito. Nello studio viene usato questo nuovo strumento con il fine di riparare un difetto osteocondrale. Come bioink è stato utilizzato un idrogel di acido ialuronico-metacrilato (HAMA) combinato con una gelatina metacrilato (GelMa) reticolati tramite polimerizzazione UV durante il processo di deposizione. Gli esperimenti in vitro che sono stati fatti, hanno dimostrato che le cellule staminali adipose umane mantengono un'elevata vitalità (> 97%) una settimana dopo la stampa eseguita con il *biopen* in idrogel GelMa/HAMA [23].

Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca ha aggiornato il *biopen*, incorporando un ugello multi-ingresso e un sistema di estrusione motorizzato multi-ingresso. Questo ha consentito di eseguire in un'unica sessione un intervento chirurgico in vivo sull'articolazione del ginocchio di pecora, in cui il bioscaffold e le cellule staminali vitali sono stati contemporaneamente estrusi in modo coassiale e caricati direttamente nel difetto condrale [24].

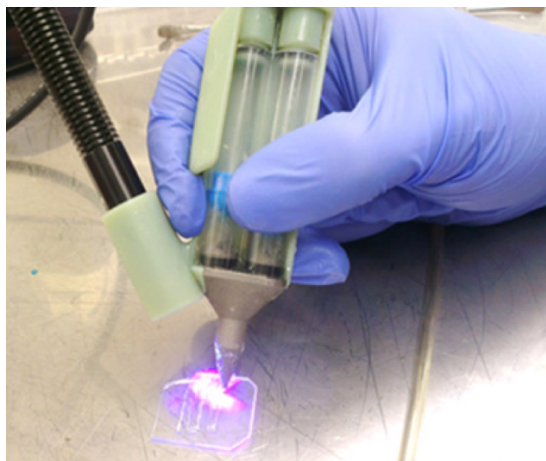


Figura 2.3: Fotografia del biopen utilizzato. È possibile notare le due camere d'inchiostro controllate tramite un sistema pneumatico. L'estrusione viene attivata tramite due pedali e il sistema di polimerizzazione UV viene regolato attraverso un terzo pedale. In figura si osserva il vetrino su cui sono state disegnate linee polimerizzate UV con idrogel metacrilato.

Uno studio della School of Mechanical Engineering, Southeast University, Nanjing City, Cina, ha eseguito studi sulla riparazione in situ tramite 3D bioprinting di un difetto della cartilagine di forma casuale [25]. Per riparare questo difetto è stato utilizzato un idrogel a base di acido ialuronico modificato. L'acido ialuronico ha molte proprietà singolari, inclusa la biocompatibilità, la viscoelasticità e la mancanza di immunogenicità. Inoltre, è uno dei componenti principali della matrice extracellulare della cartilagine (ECM) ed è coinvolto nella proliferazione cellulare, nella morfogenesi, nell'infiammazione e nella riparazione delle ferite. Questo tipo di idrogel composto da acido ialuronico fotopolimerizzabile modificato, ha

mostrato proprietà di degradazione e capacità condrogenica in uno studio precedente [26], che ne ha fortemente sostenuto l'idoneità nell'ingegneria tissutale della cartilagine.

Il gruppo di ricerca cinese ha creato appositamente un difetto condrale sul piatto tibiale di un Maialino di razza Bama. Come prima cosa, è stata rimossa tutta la cartilagine, per un'area di circa  $0.42 \text{ cm}^2$ , per simulare una lesione condrale di IV grado. Successivamente, questa è stata scannerizzata tramite la scansione 3D da tre diverse angolazioni. Questo processo ha richiesto un tempo di circa 5 minuti. Lo stesso processo è stato poi eseguito anche sul corrispettivo sito sano, in modo tale da avere la geometria precisa di ciò che deve essere stampato. Per verificare la riuscita dello studio, sono stati ricreati dei modelli in resina, i quali hanno dimostrato che le specificità morfologiche della superficie della lesione e di quella sana sono state ricreate accuratamente. Le immagini, successivamente, sono state inserite nel software "Magics" e sono state poi stampate con una stampante 3D. La geometria stampata corrispondeva interamente al contorno superficiale previsto del tessuto cartilagineo del substrato (Figura 2.4) e il tempo medio di completamento dell'intero processo di stampa è stato di 36,61s [25].

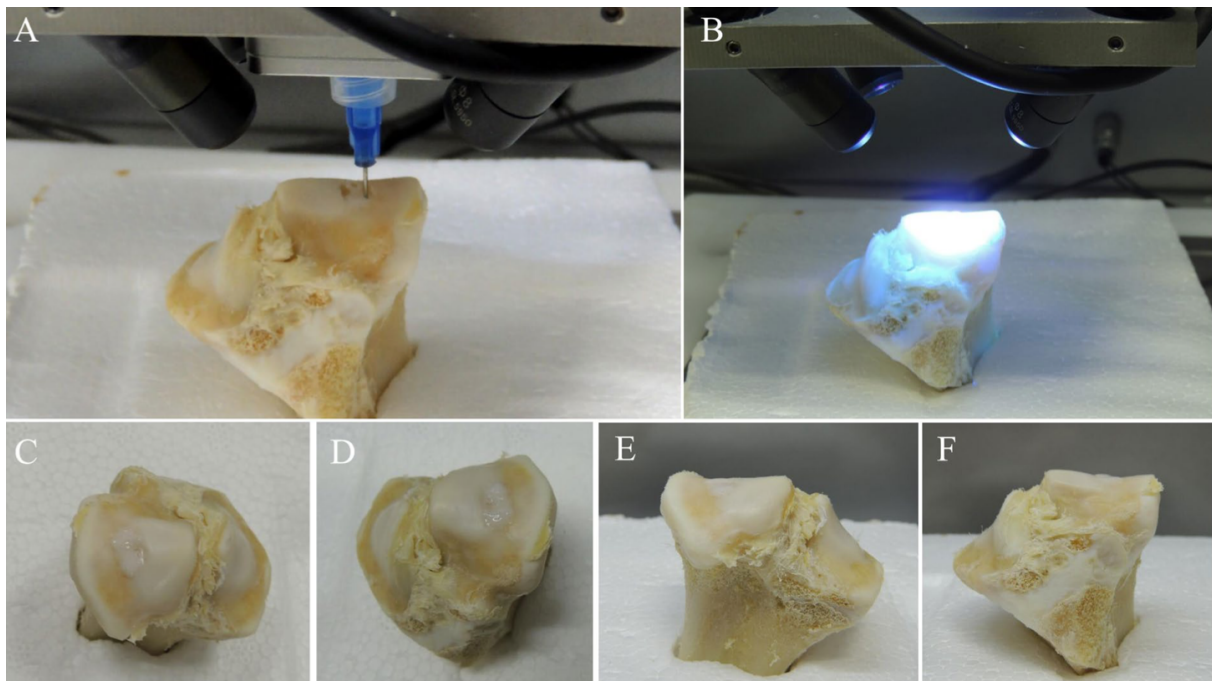


Figura 2.4: Processo di bioprinting 3D e fotopolimerizzazione su difetto condrale. La fotopolimerizzazione è stata eseguita alla fine della stampa. (A) Riparazione del difetto condrale tramite bioprinting 3D in situ con idrogel m-HA. (B) Esposizione alla luce UV. (C-F) Il colore dell'idrogel m-HA stampato per riparare il difetto condrale era bianco latte prima e dopo la fotopolimerizzazione. Il difetto condrale è stato ripristinato perfettamente.



## Capitolo 3. Sfide e prospettive future per il bioprinting in situ

### 3.1 Biomateriali e maturazione dei tessuti

La comunità scientifica sta dimostrando un crescente interesse nei confronti del bioprinting in situ grazie alle sue enormi potenzialità. Tuttavia, poiché tale tecnica è ancora in fase di sviluppo, presenta alcune problematiche da risolvere.

Un'importante questione che deve essere affrontata riguarda la scelta dell'utilizzo dei biomateriali e delle cellule. Per quanto riguarda queste ultime, la biofabbricazione in situ ne richiede un numero molto elevato; pertanto, nella maggior parte dei casi, l'espansione cellulare in vitro è comunque un requisito da soddisfare prima dell'intervento chirurgico [9]. Alla base, tuttavia, vi è un problema etico per quanto concerne l'espansione delle cellule staminali in vitro e il loro uso diretto in chirurgia. In molti Paesi l'applicazione di cellule staminali embrionali non è consentita dalla legge e questo limita e impedisce l'utilizzo. Inoltre, il processo di espansione in laboratorio di questo tipo di cellule ha anche complicazioni intrinseche, come la senescenza proliferativa e la perdita delle loro proprietà [25]. D'altra parte, l'introduzione di cellule allogeniche e materiale biologico o non biologico può indurre una risposta immunitaria inappropriata dopo la stampa. Ciò può causare uno sviluppo improprio e una scarsa integrazione del tessuto ospite del costruito, che alla fine può portare al rigetto del tessuto ospite [9].

La maturazione post-stampa dei tessuti è una problematica rilevante: questa, infatti, dipende da diversi fattori, come la fedeltà strutturale, l'apporto di nutrienti e di ossigeno, la risposta immunogenica, la proliferazione e differenziazione cellulare e la cinetica di degradazione del costruito. Studi precedenti hanno dimostrato che i diversi bioinchiostri richiedono segnali ambientali esterni post-stampa (come fotopolimerizzazione UV, esposizione chimica e cambiamento di temperatura) per consentirne il cambiamento di fase. Spesso, tuttavia, questi segnali non sono compatibili con la biostampa in situ. Sebbene in molti studi [23, 24, 25] si sia fatto ricorso alla fotopolimerizzazione UV e questa abbia dato buoni risultati, altri ricercatori ritengono che questi segnali esterni potrebbero influenzare i tessuti sani circostanti [9].

Un'altra sfida nel processo di maturazione dei tessuti riguarda l'insufficiente apporto di nutrienti e di ossigeno ai tessuti più profondi, causata dall'assenza di una rete vascolare interna. Ciò nonostante, i tessuti superficiali che richiedono una vascolarizzazione minima o nulla (come, rispettivamente, pelle e cartilagine) non presentano tale problema. Quindi, finché non si sarà in grado di trovare una soluzione efficace, l'applicazione rimarrà limitata a tali tessuti.

È importante, inoltre, verificare la biocompatibilità tra le cellule e il biomateriale; questa garantisce la proliferazione e la differenziazione cellulare, che consente anche la sostituzione da parte delle cellule dei biomateriali stampati con le proprie proteine matricellulari. La velocità di produzione delle proteine matricellulari dovrebbe corrispondere alla velocità di degradazione del biomateriale stampato, per fornire tempo sufficiente alla maturazione dei tessuti. Per controllare il tasso di degradazione in vivo, tuttavia, devono essere ancora affrontate numerose sfide [7,9].

Manca, però, ancora una soluzione adeguata per le attività che vengono eseguite post-stampa, come la garanzia di una rapida solidificazione, l'integrazione con i tessuti sani circostanti e il mantenimento di condizioni asettiche [7].

### 3.2 Costi

È necessario soffermarsi sui costi richiesti dal 3D bioprinting. In particolare, alcune tipologie di biostampanti risultano più costose rispetto ad altre: la stampa laser-assistita è la più costosa, mentre quella a getto d'inchiostro la più economica. È importante, dunque, trovare un buon equilibrio tra le caratteristiche che deve avere una biostampante, come velocità di stampa, vitalità cellulare e risoluzione, ed i costi. In Tabella 3.1 sono riportate le tipologie di stampa utilizzate per il bioprinting in situ e le loro principali caratteristiche [27].

<b>Parametri</b>	<b>Ink-jet</b>	<b>Laser-assisted</b>	<b>Stereolithography</b>
<b>Costi</b>	Bassi	Alti	Moderati
<b>Vitalità cellulare</b>	>85%	>95%	40/80%
<b>Velocità di stampa</b>	Veloce	Media	Lenta
<b>Viscosità supportate</b>	Da 3.5 mPa/s a 12 mPa/s	Da 1 mPa/s a 300 mPa/s	Da 30 mPa/s a circa $6 \cdot 10^7$ mPa/s
<b>Risoluzione</b>	Alta	Alta	Moderata
<b>Qualità della struttura verticale</b>	Bassa	Sufficiente	Alta
<b>Densità cellulare</b>	Bassa ( $<10^6$ cells/mL)	Media ( $<10^8$ cells/mL)	Alta (cellule sferoidi)
<b>Biomateriali utilizzati come bioink</b>	Alginato, collagene, PEGDMA	Collagene, matrigel	Alginato, gelMA, collagene

Tabella 3.1: Tipologie di biostampanti e le loro principali caratteristiche.

I costi possono anche portare a disparità sociali: il rischio, infatti, è quello che solo coloro che avranno le possibilità economiche per investire nelle proprie cure potranno sottoporsi a tali interventi, piuttosto che coloro che ne avranno più bisogno. Pertanto, per portare la tecnologia ad una fascia di popolazione più ampia possibile, sarà necessario garantire piani assicurativi migliori e rigorose azioni legali contro chi abuserà di tale tecnologia [28].

### 3.3 Questioni etiche e legislative

Le prospettive delle applicazioni di bioprinting in situ mantengono la promessa di un trattamento medico più efficiente, sollevando però problematiche di natura etica ed ostacoli legislativi. In particolare, l'utilizzo di questa tecnica per sostituire e/o riparare tessuti o organi all'interno del corpo umano può causare problemi di biosicurezza e responsabilità. L'uso di cellule staminali embrionali è vietato in molte nazioni, in quanto può essere interpretato da taluni come una violazione del diritto alla vita. Da non sottovalutare, anche, il potenziale inquinamento creato dalla produzione e dallo smaltimento dei biomateriali.

Una questione legislativa molto importante da affrontare è la possibilità di brevettare questa tecnologia per il commercio, assicurandone i diritti di proprietà intellettuale. Nella biostampa, i brevetti servono per proteggere il metodo di biostampa, il dispositivo, i materiali e le operazioni di post-stampa, mentre i diritti d'autore proteggono i file CAD-CAM per la scansione, la biostampa e il controllo della stessa. Nel bioprinting in situ, tuttavia, ci saranno altre procedure e dispositivi ausiliari che potrebbero rientrare nelle questioni relative alla proprietà intellettuale. Per quanto concerne la proprietà, inoltre, bisognerà anche decidere se questa appartiene al donatore delle cellule o al medico che esegue la stampa del tessuto. Mentre alcune decisioni etiche vengono prese a livello nazionale, è comunque importante avere un codice etico comune basato sul beneficio pubblico, come il rispetto per la persona, la tutela della privacy della stessa e, quindi, del proprio codice genetico. La biostampa in situ si basa principalmente sull'ottenimento di scansioni 3D (modello CAD) di un organo o di tessuto specifico del paziente che fornirà all'ingegnere ed al chirurgo informazioni di carattere medico complete sul paziente, il quale potrebbe non esserne a conoscenza. Di conseguenza, questa grande quantità di dati condivisi tra molti attori può comportare la violazione della privacy del paziente [9].

Come è facile vedere, ci sono ancora molte questioni irrisolte in ambito bioetico e legale. Queste sono dovute al fatto che la velocità di sviluppo della ricerca e l'aumento delle capacità tecnologiche superano ampiamente la velocità della comprensione delle conseguenze morali e legali delle loro potenziali applicazioni. Attualmente nel mondo non esiste né un quadro normativo adeguato né linee guida specifiche per la biostampa 3D. La difficoltà nella valutazione etica e nella regolamentazione legale della biostampa 3D è che questa tecnologia è molto fluida e si fatica a creare uno standard utile ad un'analisi.

Prima che la tecnologia di bioprinting 3D in situ si diffonda e diventi clinicamente disponibile, tuttavia, dovrebbero essere rivisti e migliorati alcuni aspetti. In primo luogo, è necessario sviluppare consensi informati per la donazione, la manipolazione del materiale, la

conservazione e il suo utilizzo, anche ai fini commerciali e di ricerca. È necessario, inoltre, sviluppare requisiti per la sicurezza, la qualità e l'efficienza delle procedure tecnologiche e dei prodotti finali ottenuti dalla biostampa 3D, tenendo conto dei diritti umani e della dignità. È di grande importanza, dunque, istituire comitati per la creazione e la regolamentazione di linee guida nazionali su questioni tecniche, legali ed etiche relative allo sviluppo e all'applicazione delle tecnologie di bioprinting 3D. Tutti i pazienti, compresi i minori e gli individui soggetti a tutela, devono essere protetti legalmente. Infine, è fondamentale calmierare il costo per le tecnologie di bioprinting 3D di organi e tessuti umani, nonché prevedere sanzioni per il traffico illegale di organi artificiali [29].

### **3.4 Prospettive future**

I prossimi traguardi su cui focalizzare la ricerca in questo ambito sono: design del dispositivo e sviluppo di un software adeguato, bioinks innovativi, sistema di scansione adeguato, integrazione di sensori di ispezione e sistema di controllo del feedback, altre modalità di stampa, sviluppo di un sistema di bioprinting multiassie e sterilizzazione. Di seguito, si cerca di illustrare ciascuno di questi punti, focalizzandosi nel modo in cui questi possono essere sviluppati.

#### *3.4.1 Design del dispositivo e sviluppo di un software adeguato*

Poiché la maggior parte degli utenti che utilizzeranno biostampanti in situ saranno chirurghi, è importante progettare il dispositivo con un'interfaccia intuitiva e un'ottima ergonomia. Infatti, i chirurghi potrebbero non essere esperti delle complessità ingegneristiche di un dispositivo. Durante la stampa, inoltre, dovrebbe esserci un coinvolgimento minimo dei chirurghi; il dispositivo dovrebbe essere in grado di controllare autonomamente i parametri di stampa come la coerenza e la ripetibilità della struttura e la stabilità delle unità di stampa. Tali parametri potrebbero essere regolati mediante l'integrazione dell'intelligenza artificiale (IA) nel dispositivo, il che rappresenterà un notevole progresso per garantire precisione e qualità chirurgica [9].

#### *3.4.2 Bioinks innovativi*

Oltre a soddisfare requisiti quali resistenza meccanica adeguata, biodegradabilità, vitalità cellulare e biocompatibilità, i bioinchiostri dovrebbero fornire una microstruttura porosa al momento della stampa e dovrebbero indurre la differenziazione delle cellule staminali stampate in cellule progenitrici che migrano dal tessuto ospite. La porosità è importante per consentire la diffusione del sangue insieme a vari fattori di crescita per la sopravvivenza delle cellule fino al

raggiungimento della neovascolarizzazione. Un metodo per ottenere ciò è produrre il bioink con un biomateriale rapidamente biorisorbibile, che renda il costruito stampato poroso [15]. Per superare la limitazione dovuta alla mancanza di un fattore di crescita, che compromette la differenziazione, il professor Xu ha sviluppato una tecnologia di stampa a getto d'inchiostro che può contemporaneamente trasfettare i geni nelle cellule viventi e impiantare queste cellule a precisi siti target [30]. Mediante la stampa in situ del gene, le cellule trasfettate daranno la possibilità di creare strutture 3D all'interno del corpo con fattori regolatori soddisfacenti cruciali per guidare lo sviluppo, la differenziazione cellulare e la rigenerazione dei tessuti funzionali. La biostampa basata sull'estrusione di cellule staminali pluripotenti indotte dall'uomo (iPSC) con bioink avanzato (alginato + carbossimetil-chitosano + agarosio) ha dimostrato di supportare la coltura di iPSC all'interno del costruito stampato [31]. La successiva proliferazione e differenziazione delle iPSC ha portato alla formazione di un corpo embrionale, rappresentativo di tutti e tre gli strati germinali (mesoderma, ectoderma ed endoderma) e ha formato tessuti neurali più omogenei comprendenti neuroni migratori funzionali. A tal fine, l'innovazione nel campo dei bioinchiostri potrà fornire un'opportunità senza precedenti nell'ambito della biostampa in situ per formare tessuti biologici 3D diversi, funzionali e rinnovabili. Tutte e tre le piattaforme di bioprinting, tuttavia, necessitano di essere ottimizzate [9].

#### *3.4.3 Sistema di scansione adeguato*

Una scansione 3D ad alta definizione di un difetto anatomico è un sistema di cui non si potrà fare a meno per fabbricare costrutti complessi mediante bioprinting robotico. In uno studio condotto dal professor Li si è preferito utilizzare la scansione 3D ad alta risoluzione (mediante uno scanner portatile 3D) rispetto alle scansioni TC e alla risonanza magnetica per creare un file .STL finale per la pianificazione del percorso della macchina; questo perché, grazie alla portabilità, alla velocità di lavoro, al costo contenuto e all'assenza di radiazioni, risulta essere la scelta più conveniente [32]. L'utilizzo di uno scanner come questo è stato recentemente (2019) utilizzato per la riparazione in situ di difetti cutanei e questo sistema ha prodotto ottimi risultati [33]. Inoltre, l'integrazione di uno scanner 3D può fornire indicazioni utili a può ridurre l'errore di stampa, consentendo di eseguire correzioni in tempo reale.

#### *3.4.4 Integrazione di sensori di ispezione e sistema di controllo in feedback*

L'integrazione del monitoraggio online e del sistema di sensori di ispezione può fornire un controllo della qualità in tempo reale durante la stampa di un costruito tessutale. A questo proposito, il sistema di visione artificiale integrato può consentire il monitoraggio della fedeltà

di stampa e della morfologia del costruito. Questo sistema può anche fornire l'opportunità di rimuovere rapidamente i tessuti non conformi per correggere il processo di bioprinting. I sensori di ispezione, come i sensori di temperatura, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, pH e umidità, sono importanti per controllare e regolare l'ambiente di stampa; inoltre, l'integrazione di un sistema di feedback minimizzerà l'errore durante la stampa e consentirà correzioni in tempo reale per garantirne la qualità [21].

Durante l'intervento, a causa di azioni respiratorie o contrazioni involontarie, le geometrie possono variare impedendo al braccio robotico di eseguire le operazioni di stampa in maniera adeguata [9]. Un recente studio del professor Zhu sembra trovare una soluzione promettente per superare questo problema [34]. È stata sviluppata una tecnica di stampa in grado di adattarsi alla superficie basata sull'estrusione integrata con retroazione negativa e un sistema di controllo basato sulla visione artificiale per consentire correzioni in tempo reale degli errori di stampa causati dalla superficie di stampa dinamica. Il sistema di tracciamento visivo comprende due telecamere di visione artificiale fissate sull'effettore della stampante 3D, che consente la localizzazione precisa della superficie di stampa. Le informazioni geometriche sono state combinate con la stima in tempo reale del movimento arbitrario della superficie target e utilizzate come input per il controller di movimento per la stampa 3D adattiva.

Sono stati effettuati altri studi per ovviare a questo problema e sono state trovate diverse soluzioni efficaci; la più promettente tra queste sembra essere l'integrazione della visione artificiale e si sta lavorando raccogliendo dati per integrare tale strumento nella biostampa. Questo, inoltre, potrà consentire la misurazione rapida e accurata dei difetti e la fabbricazione di nuovi costrutti in contesti clinici [35].

#### *3.4.5 Altre modalità di stampa*

Per avere un buon risultato utilizzando le tecniche di bioprinting è importante avere un'adeguata reticolazione, che possa fornire integrità strutturale e una buona vitalità cellulare alla struttura stampata. [36]. Ciò può non avvenire quando vi è un ritardo nel processo di reticolazione o quando questo processo danneggia le cellule, per esempio utilizzando una soluzione di reticolazione inappropriata o un'esposizione a una fonte di luce pericolosa come i raggi UV [24]. Per aggirare questo problema è possibile utilizzare nuovi modi di depositare bioinchiostri mediante bioprinting basato sull'estrusione coassiale. Questo metodo fornisce un ambiente sicuro alle cellule incapsulate nel "nucleo", mentre la soluzione di reticolazione presente nel "guscio" consente la reticolazione simultanea e confina le cellule all'interno del nucleo.

Tuttavia, la deposizione coassiale è stata eseguita solo utilizzando bioprinting basato sull'estrusione [24]. Un tipo simile di modello di deposizione dovrebbe anche essere integrato da un altro metodo di stampa (ad esempio bioprinting a getto d'inchiostro e laser) per mirare a un costrutto stampato in situ stabile e compatibile con le cellule. Inoltre, per il futuro sarebbe auspicabile arrivare ad un'integrazione di tutti i metodi di stampa per sfruttare le peculiarità di ciascuno di essi [9].

#### *3.4.6 Sviluppo di un sistema di bioprinting multiasse*

La natura irregolare e asimmetrica dei difetti anatomici richiede che la stampante abbia ampia libertà di movimento per migliorare la destrezza chirurgica. La maggior parte delle attuali tecnologie di bioprinting utilizza il sistema di movimento a tre assi per la fabbricazione del costrutto ma, a causa della ridotta capacità di movimento, è limitata la produzione di strutture complesse. Pertanto, l'aumento dei gradi di libertà fino a sei assi potrà permettere di fabbricare costrutti stampati di elevata complessità. Ad esempio, la BioAssemblyBotis è una biostampante a 6 assi basata su braccio robotico, che mira a superare i limiti associati alle biostampanti a 3 assi [37]. Un altro esempio di piattaforma flessibile è stato presentato dall'agenzia aerospaziale tedesca (DRL) con il sistema MiroSurge. Le varie parti integrate presentano molteplici gradi di libertà che ne consentono l'uso nella chirurgia mininvasiva [35]. Questi studi potrebbero fornire un'importante indicazione per l'implementazione di una tecnologia simile utilizzata per applicazioni di bioprinting in situ.

#### *3.4.7 Sterilizzazione*

Le procedure di sterilizzazione per le tecniche di bioprinting in situ sono fondamentali poiché un ambiente non sterile potrebbe compromettere l'intero processo. In un lavoro svolto dal professor Albanna, nel quale viene utilizzato un dispositivo mobile per la biostampa della pelle, egli propone una buona soluzione per ovviare a questo problema. La testina di stampa è rimovibile, in modo tale da poter essere sterilizzata in autoclave. I tubi dai quali proviene il bioinchiostro, invece, sono stati sterilizzati collegando cartucce di etanolo al 70% per 3 minuti e in seguito acqua nano-filtrata in autoclave per 1 minuto con il fine di eliminare l'etanolo residuo [33].

## **Conclusioni**

Il bioprinting in situ è una tecnologia in rapido sviluppo che permette di riparare o creare tessuti danneggiati in vivo. Grazie alla creazione di un file CAD, ottenuto tramite tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (MRI), si ottiene il modello 3D da realizzare. Successivamente, la biostampante, tramite un braccio robotico, stampa la geometria evidenziata dalle immagini riparando il difetto. Infine, il bioinchostro, ovvero un aggregato di cellule e biomateriali, permette di supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Gli studi clinici che sono stati effettuati hanno evidenziato le potenzialità che questa tecnologia possiede. In particolare, le indagini si sono concentrate sulla riparazione di difetti cutanei, ossei e condrali ed è stato dimostrato che il processo è fattibile, ma che, ad oggi, sono presenti ancora aspetti da ottimizzare come: costi troppo elevati, difficoltà nella maturazione dei tessuti e questioni etiche e legislative. I ricercatori, tuttavia, stanno lavorando per introdurre nuove soluzioni e migliorare la tecnologia. In particolare, sono sotto indagine nuovi bioinks formati da un biomateriale rapidamente biorisorbibile, che renda il costrutto stampato poroso. Inoltre, sono stati studiati nuovi metodi di scansione, più sicuri e più precisi come la scannerizzazione 3D. Infine, si stanno progettando nuove biostampanti con capacità più sviluppate grazie all'integrazione di un sistema di controllo in feedback e all'utilizzo di bracci con più gradi di libertà (fino a 6).

Le prospettive per questa tecnologia sono molto promettenti. Il bioprinting in situ presenta la strada più sicura e più attuabile per introdurre il bioprinting in ambito clinico. In particolare, allo stato attuale gli obiettivi attuabili nel breve termine sono la stampa di cute e successivamente di cartilagine.



## Bibliografia

- [1] Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2017;5(40):1-22.
- [2] Dunbar K, Blanchette I. The in vivo/in vitro approach to cognition: the case of analogy. *Trends in Cognitive Sciences*, 2001;5(8):334-339.
- [3] Groll J, Boland T, Blunk T, Burdick J, Cho D, Dalton J et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*, 2016;8(1):1-5.
- [4] Mironov V, Trusk T, Kasyanov V, Little S, Swaja R and Markwald R. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication*, 2009;1(2):1-16.
- [5] Moroni L, Boland T, Burdick J, De Maria C, Derby B, Forgacs G, et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends in Biotechnology*, 2018;36(4):384-402.
- [6] Mironov V, Reis N, Derby B. Bioprinting: a beginning. *Tissue Engineering*, 2006;12(4):631-634.
- [7] Hong N, Yang GH, Lee J, Kim G. 3D bioprinting and its in vivo applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, 2018;106(1):444-459.
- [8] Gungor-Ozkerim P, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, 2018;6(5):915-946.
- [9] Singh S, Choudhury D, Yu F, Mironov V, Naing MW. In situ bioprinting - Bioprinting from benchside to bedside?. *Acta Biomaterialia*, 2020;101:14-25.
- [10] Gudapati H, Dey M, Ozbolat I. A comprehensive review on droplet based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*, 2016;102:20-42.
- [11] Murphy S, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 2014;32:773–785.
- [12] Ozbolat I T, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 2016;76:321-343.
- [13] Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaillie CM, Odde DJ. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005;92(2):129-136.
- [14] Dunbar K, Blanchette I. The in vivo /in vitro approach to cognition: the case of analogy. *TRENDS in Cognitive Sciences*, 2001;5(8):334-339.

- [15] Murdock MH, Badylak SF. Biomaterials-based in situ tissue engineering. *Current opinion in biomedical engineering*, 2017;1(1):4-7.
- [16] Vanaei S, Parizi MS, Vanaei S, Saleemizadehparizi F, Vanaei HR. An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical Application. *Engineered Regeneration*, 2021;2:1-18.
- [17] Varkey M, Visscher DO, van Zuijlen PPM, Atala A, Yoo JJ. Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction? *Burn Trauma*, 2019,7:1-12.
- [18] Weng T, Zhang W, Xia Y, Wu P, Yang M, Jin R, Xia S, Wang J, You C, Han C, Wang X. 3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives. *Journal of Tissue Engineering*, 2021, 12:1-28.
- [19] Park YL, Park K, Cha JM. 3D-Bioprinting Strategies Based on In Situ Bone-Healing Mechanism for Vascularized Bone Tissue Engineering. *Micromachines*, 2021; 12(3):1-23.
- [20] Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amédée J, Fricain JC, Catros S. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication*, 2010;2(1):1-8.
- [21] Cohen DL, Lipton JI, Bonassar LJ, Lipson H. Additive manufacturing for *in situ* repair of osteochondral defects. *Biofabrication*, 2010;2(3):1-12.
- [22] Johnstone B, Alini M, Cucchiaroni M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauk RL, Semino CE, Stoddart MJ. Tissue engineering for articular cartilage repair- the state of art. *European Cells and Materials*;2013,25:248-267.
- [23] O'Connell CD, Di Bella, Thompson F, Augustine C, Beirne S, Cornock R, Richards CJ, Chung J, Gambhir S, Yue Z. Development of the Biopen: a handheld device for surgical printing of adipose stem cells at a chondral wound site. *Biofabrication*;2016,8(1):1-13.
- [24] Duchi S, Onofrillo C, O'Connell CD, Blanchard R, Augustine C, Quigley A.F, Kapsa RMI, Pivonka P, Wallace G, Di Bella C, Choong PFM. Handheld Co-Axial Bioprinting: Application to in situ surgical cartilage repair. *Scientific Reports*;2017,7(1):1-12.
- [25] Li L, Yu F, Shi J, Shen S, Teng H, Yang J, Wang X, Jiang Q. In situ repair of bone and cartilage defects using 3D scanning and 3D printing. *Scientific Reports*;2017,7:1-12.
- [26] Shi D, Xu X, Ye Y, Song K, Cheng Y, Di J, Hu Q, Li J, Ju H, Jiang Q, Gu Z. Photo-Cross-Linked Scaffold with Kartogenin-Encapsulated Nanoparticles for Cartilage Regeneration. *ACS nano*; 2016,10(1):1292–1299.

- [27] Mandrycky C, Wang Z, Kim CK, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*; 2016,34(4):442-434
- [28] Stankovic M, Stankovic B, Gupta R. Patentability, Global Development and Ethical Considerations of Bioprinting. *Global Forum on Law, Justice and Development*;2017:2-16.
- [29] Kirillova A, Bushev S, Abubakirov A, Sukikh G. Bioethical and Legal Issues in 3D Bioprinting. *International Journal of Bioprinting*;2020,6(3):7-16.
- [30] Xu T, Rohozinski J, Zhao W, Moorefield EC, Atala A, Yoo JJ. Inkjet-mediated gene transfection into living cells combined with targeted delivery. *Tissue Engineering Part A*;2008,15(1):95–101.
- [31] Gu Q, Tomaskovic-Crook E, Wallace GG, Crook JM. 3D bioprinting human induced pluripotent stem cell constructs for in situ cell proliferation and successive multilineage differentiation. *Advanced healthcare materials*;2017,6(17):1-11.
- [32] Li L, Yu F, Shi J, Shen S, Teng H, Yang J, Wang X& Jiang Q. *In situ* repair of bone and cartilage defects using 3D scanning and 3D printing. *Scientific Reports*;2017,7:1-12
- [33] Albanna M, Binder KW, Murphy SV, Kim J, Qasem SA, Zhao W, Tan J, El-Amin IB, Dice DD, Marco J, Green J, Xu T et al. In Situ Bioprinting of Autologous Skin Cells Accelerates Wound Healing of Extensive Excisional Full-Thickness Wounds. *Scientific Reports*;2019,9(1):1-15.
- [34] Zhu Z, Shuang-Zhuang G, Hirdler T, Eide C, Fan X, Tolar J, McAlpine MC. 3D Printed Functional and Biological Materials on Moving Freeform Surfaces. *Advanced Materials*;2018,30:1-8.
- [35] Hagn U, Ortmaier T, Konietschke R, Kubler B, Seibold U, Tobergte A, Nickl M, Jorg S, Hirzinger G. Telemanipulator for remote minimally invasive surgery. *IEEE Robotics & Automation Magazine*;2008,15(4):28–38.
- [36] Datta P, Barui A, Wu Y, Ozbolat V, Moncal KK, Ozbolat IT. Essential steps in bioprinting: From pre-to post-bioprinting. *Biotechnology Advances*;2018,36(5): 1481-1504.
- [37] Ozbolat IT, Moncal KK, Gudapati H. Evaluation of bioprinter technologies. *Additive Manufacturing*;2017,13:179–200.