



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

“STAMPA 3D E 4D PER LA RIGENERAZIONE DI SEGMENTI OSSEI”

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando: Daniele Sfera

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 28/09/2023

*“La passione permette di sopportare amarezze e rinunce
che l’ambizione non giustificherebbe in alcun modo”*

Enzo Ferrari

Indice

Abstract	pagina 8
Abbreviazioni	pagina 9
Introduzione	pagina 11
Capitolo 1: Tessuto osseo	pagina 13
1.1 Composizione	pagina 13
1.1.1 Matrice extracellulare	pagina 13
1.1.2 Componente cellulare	pagina 13
1.2 Struttura	pagina 14
1.2.1 Struttura macroscopica	pagina 14
1.2.2 Microstruttura	pagina 15
1.3 Proprietà meccaniche	pagina 16
1.3.1 Durezza	pagina 17
1.3.2 Comportamento elastico	pagina 18
1.3.3 Snervamento e rottura fragile	pagina 21
Capitolo 2: Rigenerazione del tessuto osseo	pagina 23
2.1 Rigenerazione tissutale naturale	pagina 23
2.2 Rigenerazione tissutale indotta artificialmente	pagina 25
2.2.1 Trapianto e composti sintetici	pagina 25
2.2.2 Induced Membrane Technique	pagina 27
2.2.3 Distrazione osteogenetica	pagina 27
Capitolo 3: Stampa 3D: preparazione e tecnologie	pagina 31
3.1 Progettazione del modello 3D: requisiti essenziali	pagina 33
3.2 Realizzazione del modello 3D	pagina 34
3.2.1 Scansione della regione anatomica	pagina 34
3.2.2 Processazione delle immagini: segmentazione	pagina 35
3.2.3 Processazione delle immagini: modifica e preparazione alla stampa	pagina 37
3.3 Tipologie di stampa	pagina 41
3.3.1 Powder-based AM	pagina 42
3.3.2 Inkjet-based AM	pagina 43
3.3.3 Materials extrusion AM	pagina 45
3.3.4 Vat photopolymerization	pagina 47

3.3.5 Laser Induced Forward Transfer	pagina 48
Capitolo 4: Stampa 3D: produzione di sostituti ossei e scaffold	pagina 53
4.1 Materiali metallici	pagina 54
4.1.1 Tipologie di metalli	pagina 55
4.1.1.1 Tantalio	pagina 55
4.1.1.2 Titanio	pagina 55
4.1.1.3 Magnesio	pagina 57
4.1.1.4 Leghe di cobalto-cromo	pagina 58
4.1.2 Trattamenti post-printing per i materiali metallici	pagina 58
4.2 Materiali ceramici	pagina 59
4.2.1 Tipologie di ceramici	pagina 60
4.2.1.1 Vetri biologici	pagina 60
4.2.1.2 Silicati di calcio	pagina 60
4.2.1.3 Fosfati di calcio	pagina 61
4.2.2 Trattamenti post-printing per i materiali ceramici	pagina 63
4.3 Materiali polimerici	pagina 63
4.3.1 Caratteristiche dei bioink	pagina 65
4.3.1.1 Comportamento reologico	pagina 65
4.3.1.2 Linee cellulari	pagina 67
4.3.1.3 Fattori di crescita	pagina 68
4.3.1.4 Meccanismi di crosslinking	pagina 69
4.3.2 Polimeri sintetici	pagina 69
4.3.2.1 Polichetoni (PEEK, PAEK)	pagina 70
4.3.2.2 Polieteri (PEG)	pagina 71
4.3.2.3 Poliesteri (PGA, PLA, PLGA, PCL)	pagina 72
4.3.2.4 Pluronic® F-127	pagina 74
4.3.3 Polimeri naturali	pagina 75
4.3.3.1 Polisaccaridi (Acido ialuronico, Alginato, Chitosano)	pagina 75
4.3.3.2 Proteine (Collagene, Gelatina)	pagina 79
4.3.4 Trattamenti post-printing per i materiali polimerici	pagina 82
4.4 Trattamenti post-printing generici	pagina 82
Capitolo 5: Caso di studio	pagina 85

Capitolo 6: Bioprinting 4D	pagina 89
6.1 Tecnologie basate su variazioni di forma	pagina 89
6.1.1 Scaffold reattivi a stimoli interni	pagina 89
6.1.2 Scaffold reattivi a stimoli esterni	pagina 90
6.2 Tecnologie basate su trasformazioni funzionali	pagina 91
6.3 Esempio applicativo	pagina 92
6.4 Limiti	pagina 92
Conclusioni	pagina 95
Bibliografia	pagina 99
Ringraziamenti	pagina 103

Abstract

Nonostante i continui progressi della medicina nel trattamento delle patologie ortopediche, diverse sfide rimangono tuttora aperte. Fra queste primeggia il caso del trattamento dei difetti ossei di dimensione critica, la cui gravità è tale da impedire una naturale guarigione.

Il presente elaborato parte da un'introduzione sul tessuto osseo, con riferimento particolare alle modalità di rigenerazione attualmente disponibili, per poi illustrare l'uso della stampa 3D nell'ingegneria tissutale. Il recente perfezionamento del 3D printing, del bioprinting e dei materiali impiegati, ha permesso di delineare prospettive inimmaginabili fino a qualche decennio fa, con risultati molto promettenti. Nella parte finale della tesi si farà menzione alla ricerca e agli scenari che la stampa 4D può attualmente aprire.

Abbreviazioni

#

2P-SL	Two-Photon Stereolithography
3DP	Three-Dimensional Printing
μCT	Micro Computed Tomography
μMRI	Micro Magnetic Resonance Imaging

A

AB	Antibiotic
Alg	Alginate
AlgMA	Alginate Methacrylate
AM	Additive Manufacturing
ASC	Adipose-derived Stem Cell

B

B-Rep	Boundary Representation
BG	Bioglass®
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow Stem Cell

C

CAD	Computer Aided Design
CAM	Computer Aided Manufacturing
CaP	Calcium Phosphate
CE	Conformité Européenne
CFR	Carbon Fiber Reinforced
CJP	Continuous Jetting Printing
CLIP	Continuous Liquid Interface Printing
CMF	Cranio-Maxillofacial
CNC	Computer Numerical Control
CNM	Carbon Nanomaterial
Col	Collagen
Col-MA	Collagen Methacryloyl
CP-Ti	Pure titanium
CS	Chitosan
CSD	Critical Size Defect
CSG	Constructive Solid Geometry
CSi	Calcium Silicate
CSMA	Methacrylate Chitosan
CT	Computed Tomography
CTF	Cell Traction Force

D

DBM	Demineralised Bone Matrix
DED	Direct Energy Deposition
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DLP	Digital Light Processing
DLW	Direct Laser Writing
DMD	Digital Micromirror Device
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOD	Drop On Demand

E

EBB	Extrusion-Based Bioprinting
EBM	Electron Beam Melting
EC	Endothelial Cell
ECM	Extracellular Matrix
EUR	Euro

F

FDA	Food and Drug Administration
FDM	Fusion Deposition Modeling
FEM	Finite Element Method
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRI	Fracture-Related Infection

G

GBP	British pound sterling
Gel	Gelatin
Gel-MA	Gelatin-Methacryloyl

H

HA	Hydroxyapatite
HAMA	Hyaluronic Acid Methacrylate
HUVEC	Human Umbelical Vein Endothelial Cell

I

IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1	Interleukin-1

L

LCD	Liquid Crystal Display
LCST	Loewr Critical Solution Temperature
LIFT	Light Induced Forward Transfer
LOHS	Length of Hospital Stay

M

MBG	Mesoporous Bioglass
MDCT	Multiple-row Detector CT
MIMICS	Materialise Interactive Medical Image Control System
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MSC	Mesenchymal Stem Cell

P

PA	Polyamide
PAEK	Polyarylether Ketone
PCL	Polycaprolactone
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEEK	Polyether-Ether-Ether-Ketone
PEG	Polyethylene Glycol
PEGDA	Polyethylene Glycol Diacrylate
PEGDMA	Polyethylene Glycol Dimethacrylate
PEGMA	Polyethylene Glycol Methacrylate
PET	Positron Emission Tomography
PGA	Polyglycolic acid
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(lactic)-co-glycolic acid
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PNIPAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
POC 3DP	Point Of Care 3D Printing
PVD	Physical Vapor Deposition
PVE	Partial Volume Effect

R

RIA	Reamer/Irrigator/Aspirator
ROI	Region Of Interest

S

SLA	Stereolithography
SLM	Selective Laser Melting
SLS	Selective Laser Sintering
SMM	Shape Memory Material
SOE	Spatial Occupancy Enumeration
SPECT	Single Photon Emission Tomography
SSM	Statistical Shape Model
STL	Standard Triangulation Language / Standard Tessellation Language

T

TCP	Tricalcium Phosphate
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIFF	Tagged Image File Format
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TT	Trabecular Titanium [®]

U

UCST	Upper Critical Solution Temperature
UE	Unione Europea (European Union)
US	Ultrasound
USA	United States of America
USD	United States Dollar
UV	Ultraviolet

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VP	Vat Photopolymerization
VRML	Virtual Reality Modeling Language

X

X3D	Extensible 3D
-----	---------------

Introduzione

Da secoli a questa parte, una delle sfide cruciali della medicina riguarda la totale integrazione fra corpo umano e dispositivi artificiali, siano essi prodotti per migliorare una condizione esistente o, più comunemente, siano essi creati per ovviare ad uno stato patologico.

La peculiarità dello sviluppo odierno, rispetto a quello del passato, risiede però nell'approccio che si vuole adottare, che rappresenta un cambio di paradigma fondamentale: dalla classica concezione della medicina, in cui ogni paziente viene inteso come parte di un gruppo e trattato alla stessa maniera degli altri, si osserva ora una transizione verso un trattamento specifico per ciascun individuo. Questo approccio, che negli anni sta attirando sempre più attenzione e fondi pubblici, è denominato "medicina di precisione", ed è definito come "un approccio innovativo per il trattamento e la prevenzione di patologie, che prende in considerazione le diversità fra i singoli individui correlate alla genetica, allo stile di vita e all'ambiente in cui si trovano" [1].

Tale concetto assume quindi una valenza molto maggiore se si pensa alla vastità degli ambiti di applicazione e, in particolar modo, se ci si focalizza su aree particolarmente critiche quali i trapianti o la rigenerazione tissutale, diviene il fulcro della ricerca attuale e futura.

Al giorno d'oggi, la tecnologia più promettente per il raggiungimento della (ideale) integrazione fra materiale esogeno impiantato e tessuto naturale, pare essere la stampa 3D, ampiamente apprezzata per il controllo che permette di avere su geometria, microstruttura e composizione del prodotto realizzato. L'accuratezza della produzione additiva rappresenta un elemento di primaria importanza. In alcuni tessuti, infatti, l'intrinseca complessità strutturale e funzionale ostacola la loro sostituzione con materiali tradizionali, richiedendo almeno l'impiego di materiali compositi, se non addirittura il trapianto o la rigenerazione mediante l'uso di materiali innovativi.

Partendo da ciò, nel presente elaborato, si analizza il caso della rigenerazione del tessuto osseo, con specifico riferimento ai difetti di segmenti ossei di dimensione critica (CSD), dovuti ad asportazione di tumori, gravi traumi, operazioni di revisione delle protesi, infezioni o mancata unione di fratture. Questo stato patologico, oltre ad avere un notevole impatto dal punto di vista psicologico sul paziente, in quanto, con le tecnologie attuali, il possibile completo recupero (non sempre garantito) richiede interventi chirurgici e mesi di convalescenza, ha anche un enorme impatto economico. Si stima infatti, che ogni operazione di questo tipo abbia un costo singolo pari a \$ 300 000 [2], oltre a coinvolgere anche il settore dei trapianti: il tessuto osseo è secondo solo alle trasfusioni di sangue, con un costo per la sanità statunitense pari a 1.2-2.5 miliardi USD (dati 2005) [3].

Gli studi attuali si focalizzano quindi sullo sviluppo di tecnologie a basso costo, in grado di ovviare ai problemi di biocompatibilità, biotossicità e rigetto, e capaci di stimolare un'adeguata e completa

integrazione dell'impianto esogeno con il tessuto osseo, riproponendo dunque le proprietà originarie dell'osso sano.

Nella presente tesina, il primo capitolo introduce i concetti fondamentali relativi alla composizione, struttura e proprietà meccaniche del tessuto osseo, a cui segue una breve trattazione della rigenerazione tissutale naturale e delle tecniche artificiali attualmente disponibili. Successivamente si considerano la preparazione e i materiali impiegati per la stampa 3D e per il bioprinting, con l'accento a tre casi di studio degni di nota. Infine, nell'ultimo capitolo, si fa riferimento alle prospettive che la stampa 4D può aprire nella ricerca futura.

Capitolo 1: Tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo, caratterizzato dalla presenza di una matrice extracellulare (ECM) mineralizzata e da un elevato grado di specializzazione. Svolge primariamente la funzione di sostegno del corpo, protezione degli organi interni e riserva di calcio e fosforo, rivestendo quindi un ruolo importante anche a livello metabolico, oltre a quello meccanico-strutturale. In questo capitolo si procede con l'analisi della composizione del tessuto osseo, proseguendo con una valutazione delle proprietà meccaniche e strutturali.

1.1 Composizione

1.1.1 Matrice extracellulare

Analizzando la matrice extracellulare si possono distinguere tre componenti principali: la componente organica, quella inorganica e l'acqua. La prima costituisce circa il 22% del peso totale ed è formata prevalentemente da collagene (90-96%) seguito da altre molecole organiche (4-10%), quali proteoglicani, glicoproteine, fattori di crescita ed enzimi. La seconda impatta sul peso totale per circa il 69% e ha una struttura fondamentale a base di apatiti (85%), fosfati di calcio e magnesio, carbonato di calcio e fluoruro di calcio. Infine, l'acqua ricopre la restante parte, pari a circa il 9%.

La proprietà fondamentale del tessuto, ossia la durezza, è dovuta però solo alla matrice inorganica, di cui le idrossiapatiti (HA) rappresentano le componenti principali. Queste si presentano sotto forma di cristalli aghiformi, con unità ripetitiva identificata dalla formula bruta: $[Ca_{10}(PO)_4(OH)_2]$ e sono chimicamente stabili solo a pH neutro, mentre tendono a dissociarsi a pH acido.

1.1.2 Componente cellulare

La componente cellulare è costituita da quattro tipologie differenti di cellule: preosteoblasti, osteoblasti, osteociti e osteoclasti (Figura 1.1). Queste, complessivamente, permettono la continua crescita, riparazione e rimodellamento del tessuto osseo.

Nello specifico, i preosteoblasti (o cellule osteoprogenitrici) derivano dalle cellule mesenchimali per differenziazione e sono fondamentali nel processo di formazione dell'osso, in quanto rilasciano fattori di crescita e differenziamento che ne regolano la produzione. Inoltre, essi, stimolati dalle proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), prima proliferano e successivamente si trasformano in osteoblasti, responsabili della sintesi e della regolazione della componente organica della ECM. Una volta che si è conclusa la fase di deposizione della sostanza organica, questi ultimi, intrappolati all'interno delle lacune ossee divengono osteociti, ossia l'effettiva popolazione cellulare dell'osso maturo, mentre quelli non intrappolati entrano in una fase di quiescenza diventando semplicemente osteoblasti inattivi.

Infine, gli osteoclasti sono le principali cellule finalizzate al riassorbimento del tessuto osseo, merito anche delle loro dimensioni particolarmente elevate (fino a 100 - 200 μm). Queste sono cellule polinucleate avente fino a 50 - 100 nuclei al loro interno e derivano dalla differenziazione di cellule staminali ematopoietiche.

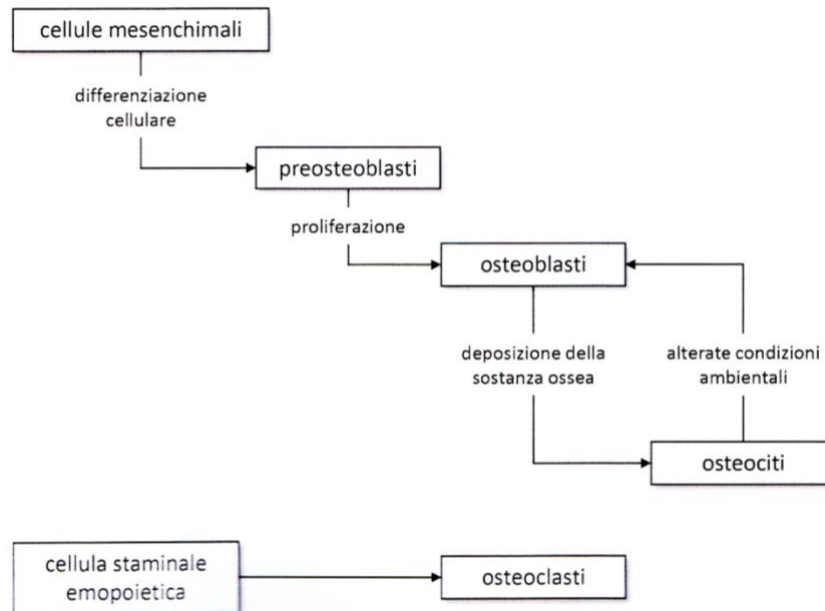


Figura 1.1: le cellule dell'osso e la loro origine.

1.2 Struttura

La struttura dell'osso può essere oggetto di analisi sia a livello macroscopico, sia a livello microscopico.

1.2.1 Struttura macroscopica

Si possono distinguere le ossa lunghe da quelle brevi e da quelle piatte, in primis per la dimensione e la forma geometrica, ma anche per come si presentano all'interno. Nelle ossa lunghe sono presenti epifisi, metafisi e diafisi, corrispondenti rispettivamente all'estremità, alla parte ad essa adiacente e alla parte centrale allungata dell'osso.

Sezionandolo trasversalmente invece, partendo dall'esterno e proseguendo verso il centro, si nota la presenza del periostio, seguito da uno strato di osso compatto (prevalente nelle diafisi), da uno di osso spugnoso (preponderante nell'epifisi), per arrivare infine all'endostio e al midollo osseo.

Il periostio è una lamina connettivale fibrosa, a base di collagene, la cui importanza è particolarmente nota nel caso della riparazione di fratture, dal momento che una sua carenza implica una guarigione molto più lenta. Come il periostio, anche l'endostio è una membrana con potenzialità osteogeniche,

con la differenza però che quest'ultima ha anche proprietà ematopoietiche e si trova principalmente a ridosso della cavità midollare e dei canali di Havers.

Le componenti restanti, ossia l'osso compatto e l'osso spugnoso hanno rispettivamente l'aspetto di una massa solida continua e di un solido alveolare (quindi poroso, con porosità compresa fra 40% e 95% e frazione volumica fra 10% e 60% [4]) costituito da trabecole orientate secondo le direzioni di trasmissione delle sollecitazioni.

1.2.2 Microstruttura

A livello microscopico la struttura dell'osso dipende strettamente dalla tipologia di tessuto coinvolta: per i tessuti di nuova formazione si parla di tessuto osseo fibroso, mentre per i tessuti maturi e completi si parla invece di tessuto osseo lamellare.

In particolar modo, il tessuto osseo fibroso è composto da fibre di collagene di rilevanti dimensioni (5-10 μm di diametro) che si intrecciano in ogni direzione. Questo ha un basso grado di ordine ed è quindi il primo ad essere depositato durante i processi riparativi, per poi venire riassorbito e sostituito con il tessuto osseo lamellare. Il tessuto osseo lamellare, nell'adulto, forma invece quasi completamente l'osso compatto (nonché buona parte di quello spugnoso), anche se richiede più tempo per la sua produzione e deposizione poiché è composto da strati ordinati e sovrapposti di fibre di collagene e osteociti, atti a formare le lamelle ossee. Si noti però che la precisa disposizione delle lamelle è correlata al sito di deposizione e che, a seconda del loro stesso assetto, si possono identificare a loro volta due tipologie di tessuto lamellare: quello semplice, formato da lamelle parallele fra loro (spesse 3-7 μm) e quello osteonico, la cui organizzazione è basata sull'osteon.

L'osteon, formato da un gruppo di 8-10 lamelle concentriche disposte radialmente attorno al canale di Havers, costituisce l'unità fondamentale e funzionale dell'osso compatto e ha un diametro che varia fra 150 e 250 μm . Esso è rifornito di sostanze nutritive principalmente dai canali di Havers e dai canali di Volkmann, costituenti un sistema di canali vascolari rispettivamente paralleli e perpendicolari alla direzione dell'asse osteonico. Inoltre, tale unità di base si dispone all'interno dell'osso con il proprio asse longitudinale parallelamente alle direzioni di sollecitazione, così da conferire maggiore rigidità.

Le lacune ossee sono cavità di piccole dimensioni della matrice minerale al cui interno si trovano gli osteociti e sono interconnesse fra loro tramite i cosiddetti canalicoli ossei, ramificati in ogni direzione al fine anche di ottimizzare gli scambi metabolici fra sangue e tessuto [5], [6] (Figura 1.2).

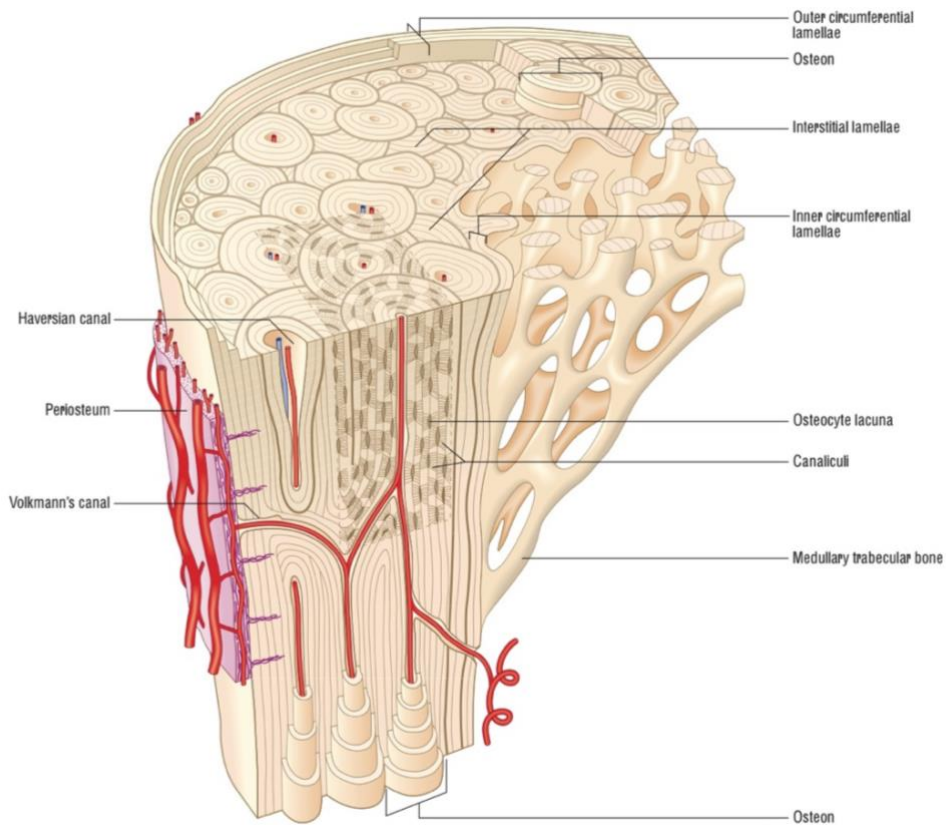


Figura 1.2: schema della struttura del tessuto osseo primario, inclusivo di periostio, osso compatto e spugnoso e strutture microscopiche (osteoni, lacune, canalicoli, lamelle interstiziali, canali di Havers e canali di Volkmann).

1.3 Proprietà meccaniche

Per indagare qualitativamente e quantificare le proprietà meccaniche dell'osso è necessario riprendere gli elementi illustrati in precedenza, relativi a composizione e struttura, uniti ad alcuni fondamenti della meccanica dei solidi e dei corpi continui.

Per prima cosa, affinché si possano confrontare i parametri strutturali fondamentali, come per esempio il modulo elastico, è essenziale renderli indipendenti dalla forma e dalla geometria del campione su cui si effettuano le misure, pertanto, non si considerano l'intensità delle forze applicate e gli allungamenti, ma piuttosto si prendono in considerazione tensioni e deformazioni, espresse rispettivamente in $[N/mm^2]$ (σ , equivalentemente, $[MPa]$) e in numeri puri.

A partire da tale concetto e, assunto che si studia il problema per corpi per cui vale l'ipotesi del continuo di Cauchy nel campo delle deformazioni infinitesime ($\varepsilon < 3\%$), si definiscono i parametri fondamentali (Tabella 1.1), validi per prove uniassiali di materiali elastici lineari isotropi [7].

Tuttavia, l'osso, per via della sua struttura, non può essere definito isotropo, in quanto, a livello macroscopico, il tessuto osseo è disposto radialmente intorno alla cavità midollare, mentre a livello microscopico gli osteoni (anch'essi dotati di simmetria radiale) e le trabecole sono disposti lungo l'asse longitudinale, così da essere paralleli alla direzione di carico e conferire maggior resistenza.

Tensione di Cauchy	$\sigma = \frac{F}{A}$	Sforzo tangenziale	$\tau = \mu * \gamma$
Deformazione nominale	$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$	Coefficiente di Poisson	$\nu = -\frac{\varepsilon_t}{\varepsilon}$
Modulo di Young	$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$	Modulo elastico tangenziale	$G = \mu = \frac{E}{2(1 + \nu)}$

Tabella 1.1: richiami di meccanica dei solidi e dei continui, formule essenziali.

Dunque, l'osso può essere classificato come materiale composito anisotropo, sia per quanto concerne l'osso corticale, sia per quanto riguarda quello trabecolare, con proprietà meccaniche differenti fra la direzione radiale, circonferenziale e longitudinale.

Dall'analisi dei dati relativi a queste proprietà, si può dimostrare la validità e la precisione dei modelli ortotropi, ma, volendo semplificare il problema, è possibile anche approssimare l'osso ad un materiale elastico lineare trasversalmente isotropo. In questo modo, i parametri costitutivi necessari a definire il tensore della tensione si riducono da 21 (materiale elastico lineare anisotropo), prima a 9 (materiale elastico lineare ortotropo), e infine a 5 (materiale elastico lineare trasversalmente isotropo), implicando una considerevole diminuzione della complessità del problema in questione [4], [8].

1.3.1 Durezza

Analizzando nello specifico le singole proprietà, partendo dalla durezza, si ricorda come questa sia dovuta soprattutto alle apatiti da cui è formata la matrice organica, che costituiscono un tessuto duro e difficilmente scalfibile. All'interno del corpo umano sono però ammesse variazioni di questo parametro dipendenti dalla tipologia di tessuto osseo (corticale o trabecolare), dal sito anatomico (Figura 1.3) e, al suo interno, dalla disposizione stessa del materiale.

In merito a questi fattori di variabilità, l'osso corticale delle ossa lunghe (misurato nella diafisi) risulta essere molto più duro rispetto a quello trabecolare (misurato nell'epifisi), con una differenza, in percentuale, compresa fra l'8.85% e il 40.39%, a seconda del sito anatomico. Tale discrepanza non riguarda però altre tipologie di ossa più corte, come le vertebre lombari, in cui l'osso trabecolare risulta essere addirittura più duro di quello compatto [8].

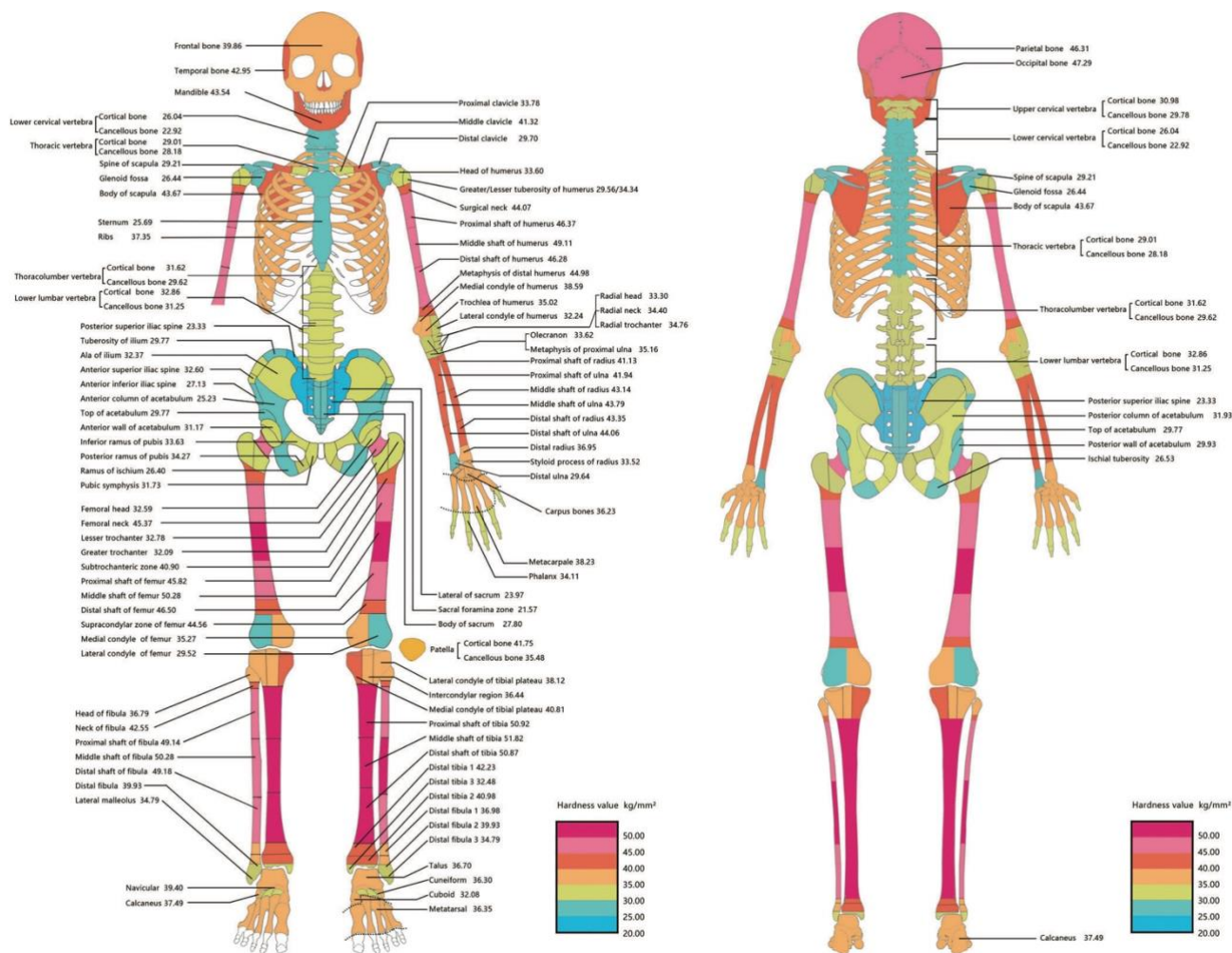


Figura 1.3: distribuzione della durezza a livello microscopico.

1.3.2 Comportamento elastico

Essendo l'osso un materiale composito, gode di proprietà meccaniche migliori rispetto a quelle manifestate dai singoli materiali omogenei che lo compongono. In particolar modo, la matrice organica (specialmente le fibre di collagene, aventi modulo elastico $E_{dry\ collagen} = 6\text{ GPa}$) garantisce una certa resistenza a trazione, compressione e torsione, proteggendo anche dal fenomeno di rottura fragile; la matrice inorganica conferisce durezza e rigidità ($E_{hydroxyapatite} = 80\text{ GPa}$), salvaguardando il tessuto dal fenomeno di snervamento [5], [9], [10]. Tuttavia, questo effetto sinergico fra i vari componenti non è mirato ad avere le migliori specifiche meccaniche sia in trazione, sia in compressione, ma è piuttosto finalizzato ad aumentare la resistenza nelle direzioni necessarie. In particolare, l'osso è in grado di evolversi nel tempo mediante un continuo rimodellamento, minimizzando il materiale impiegato e il peso della struttura, orientandosi inoltre lungo le linee di massima tensione così da sopportare meglio i carichi esterni. Ciò è favorito anche dalla disposizione stessa del tessuto osseo intorno alla cavità midollare che, posto ad una certa distanza, permette di avere maggior momento di inerzia e quindi rigidezza flessionale [6], [9].

Dunque, volendo inquadrare il comportamento meccanico del tessuto in questione nella maniera più semplice, lo si può definire puramente elastico (Figura 1.4), nonostante manifesti anche caratteristiche riconducibili alla viscoelasticità e all'elastoplasticità incrudente. Tali elementi sono però trascurabili in quanto relativi a fenomeni molto lenti e prolungati nel tempo o comunque di entità irrilevante per i normali sforzi fisiologici.

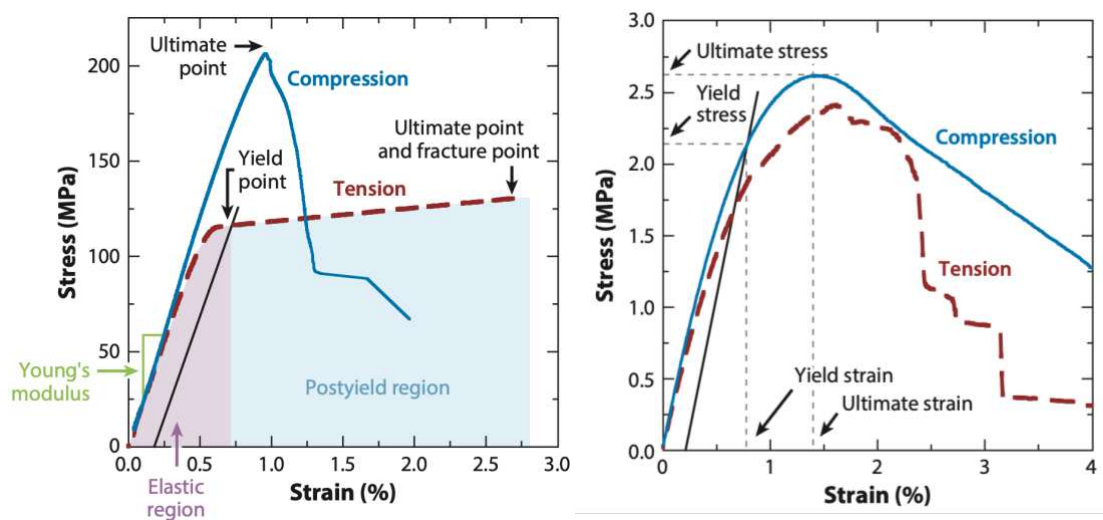


Figura 1.4: curve sforzo - deformazione di osso corticale (a sinistra) e trabecolare (a destra).

A partire da tale assunzione, si quantificano ora le proprietà meccaniche.

Per quanto riguarda l'aspetto macroscopico dell'osso corticale, lungo l'asse longitudinale si è osservato un modulo elastico compreso fra 11-21 GPa, mentre lungo la direzione trasversale questo spazia fra 5-13 GPa (nella Figura 1.5 sono tabulati i valori per l'osso corticale femorale). Inoltre, dal momento che, per le ossa lunghe, le fisiologiche sollecitazioni flessionali determinano l'insorgenza di carichi di trazione e compressione, la tensione di snervamento in compressione e trazione lungo l'asse longitudinale vale rispettivamente 60-70 MPa e 70-280 MPa; mentre lungo l'asse trasversale è circa pari a 50 MPa in entrambi i casi.

A livello microscopico, invece, si è notato come il modulo di Young si riduca a 5-12 GPa (per sforzi di trazione e compressione), mentre il modulo elastico tangenziale valga 4 GPa (per sforzi di taglio). Anche l'osso trabecolare assume valori simili, con modulo elastico che spazia fra 1.2-22.3 GPa, e che sembra essere generalmente inferiore del 10% rispetto all'omologo dato locale dell'osso compatto. Tuttavia, a seconda delle fonti considerate questo dato può variare anche oltre questa soglia.

Infine, i valori di deformazione di snervamento (in trazione) e tensione di snervamento (in trazione e compressione) sono rispettivamente minori di circa il 15% e il 25% rispetto a quelli misurati per il tessuto osseo corticale, con tensione di rottura a trazione compresa fra 2-12 MPa.

Tali risultati sono inoltre soggetti a sensibili variazioni se nell'osso compatto sono presenti anomalie riguardanti i legami inter-catena fra le molecole di collagene e il grado di porosità (normalmente compreso fra 5% e 15%), oppure se ci sono variazioni inerenti alla frazione volumica (rapporto del tessuto osseo mineralizzato sul volume totale dell'osso) o alla densità apparente (rapporto fra la massa del tessuto osseo e il volume totale dell'osso) per l'osso trabecolare.

Infine, un ruolo fondamentale nella capacità di sopportare carichi esterni è rivestito anche dal valore della densità tissutale che normalmente si attesta intorno a $2.0 \frac{g}{cm^3}$ [4], [10]–[12].

Longitudinal direction	
Elastic modulus (MPa)	17,900 ± 3,900 ^b 18,160 ± 1,880 ^c
Poisson's ratio	0.62 ± 0.26 ^b
Tensile yield stress (MPa)	71.56 ± 10.19 ^{c,f}
Tensile yield strain (%)	0.67 ± 0.04 ^{c,f}
Tensile ultimate stress (MPa)	135 ± 15.6 ^b 92.95 ± 10.07 ^c
Tensile ultimate strain (%)	1.9 ± 0.6 ^c
Compressive yield stress (MPa)	115.06 ± 16.36 ^{c,f}
Compressive yield strain (%)	0.98 ± 0.09 ^{c,f}
Compressive ultimate stress (MPa)	205 ± 17.3 ^b 153.59 ± 21.63 ^c
Compressive ultimate strain (%)	1.3 ± 0.3 ^c
Shear modulus (MPa)	3,300 ± 400 ^c 6,070 ± 570 ^c
Shear yield stress (MPa)	40.95 ± 5.16 ^{c,f}
Shear yield strain (%)	0.87 ± 0.04 ^{c,f}
Shear ultimate stress (MPa)	65 ± 4.0 ^b 46.31 ± 5.82 ^c
Transverse direction	
Elastic modulus (MPa)	10,100 ± 2,400 ^b 5,650 ± 1,610 ^d 6,490 ± 3,220 ^e
Poisson's ratio	0.62 ± 0.26 ^b
Tensile ultimate stress (MPa)	53 ± 10.7 ^b
Compressive yield stress (MPa)	41.8 ± 19.4 ^d 44.1 ± 21.1 ^e
Compressive yield strain (%)	0.83 ± 0.42 ^d 0.84 ± 0.23 ^e
Compressive ultimate stress (MPa)	131 ± 20.7 ^b 65.2 ± 13.8 ^d 63.1 ± 20.7 ^e

Figura 1.5: Misure di modulo elastico, tensioni e deformazioni di snervamento e rottura in osso corticale femorale. Gli apici "a" indicano che i dati derivano da test meccanici su campioni con dimensione caratteristica dell'ordine di 1 cm; "b" e "c" sono riferimenti alla bibliografia dell'articolo; "d" ed "e" indicano che sono misure effettuate sulle direzioni circonferenziali e radiali; "f" denota che il dato è stato calcolato con un adeguamento del 0.2%

1.3.3 Snervamento e rottura fragile

Per quanto concerne la determinazione del limite elastico del tessuto osseo, i criteri di snervamento e rottura richiedono ancora una volta la distinzione fra osso corticale e trabecolare: infatti, nel primo caso si sfruttano relazioni derivanti dal criterio di Tsai-Wu, che tengono conto dell'anisotropia del materiale e degli sforzi multi-assiali a cui può essere sottoposto, mentre per il secondo non è ancora stato ben definito un criterio valido e accurato.

Nonostante ciò, gli elementi fondamentali da tenere in considerazione per l'osso sono i seguenti:

- può essere classificato come un materiale fragile, dato che la massima deformazione (plastica) ammissibile, prima della rottura, è pari a circa il 3% (quindi nel range delle deformazioni infinitesime);
- l'osso trabecolare sopporta meglio le sollecitazioni flessionali rispetto all'osso compatto, e, successivamente all'applicazione del carico in questione, non riporta drastici peggioramenti delle proprietà meccaniche;
- i micro-danni interni all'osso possono costituire elementi di fragilità e contemporaneamente possono dare origine a fenomeni di incrudimento;
- grazie alla presenza della linea cementizia che unisce gli osteoni alla matrice adiacente, la propagazione delle fratture in corrispondenza di queste strutture è molto più facile lungo l'asse longitudinale, rispetto a quello trasversale, permettendo così la deviazione della direzione di propagazione della frattura e ostacolando la completa rottura dell'osso, da parte a parte [4], [10].

Capitolo 2: Rigenerazione del tessuto osseo

Il tessuto osseo possiede una straordinaria capacità di rigenerazione che esso manifesta a seguito di una lesione o di una frattura. Tuttavia, talvolta la rigenerazione è incompleta/inefficace come nel caso del trattamento di traumi, infezioni, fratture complesse o tumori. È questo il caso dei difetti ossei di dimensione critica (Critical-Sized Defect, CSD), di cui però non esiste una definizione universalmente riconosciuta. Ad ogni modo, quella più diffusa identifica i CSD come difetti di dimensioni variabili a seconda del sito anatomico, e pari almeno a 2 - 2.5 volte il diametro dell'osso in questione o, se non si tratta di CSD segmentali, aventi una carenza di tessuto osseo superiore al 50% della circonferenza.

Da ciò si intuisce subito la rilevanza che questo stato patologico riveste sotto il punto di vista fisiologico e psicologico per i pazienti, dal momento che, senza intervento chirurgico non potrebbero guarire, mentre, nel caso in cui si sottoponessero all'operazione, la convalescenza richiederebbe svariati mesi. Scendendo nello specifico e analizzando qualche dato relativo ai CSD legati alle fratture ossee, si nota come, seppur rivestano solo lo 0.4% di tutte le fratture registrate in un decennio, hanno un costo sanitario non indifferente, arrivando a toccare i 300 000 \$ per ogni paziente [2], [11], [12]. Pertanto, un miglioramento nel trattamento di questi casi potrebbe comportare un sensibile abbattimento dei costi, e d'altra parte offrirebbe ai pazienti una migliore prospettiva di guarigione. In questo capitolo si presentano quindi alcuni cenni relativi alla naturale guarigione delle lesioni, seguiti poi dalle varie tecniche attualmente utilizzate per il trattamento dei CSD.

2.1 Rigenerazione tissutale naturale

Schematizzando la naturale rigenerazione del tessuto osseo a seguito di una lesione, si distinguono quattro fasi principali:

1. Emostasi (inizia subito e termina nell'arco di qualche ora al massimo)
2. Infiammazione (inizia durante l'emostasi e dura svariati ore o giorni)
3. Riparazione (inizia circa una settimana dopo la lesione e richiede giorni o settimane)
4. Rimodellamento (inizia dopo la riparazione e richiede svariati mesi)

La fase iniziale di emostasi è mirata al mantenimento dell'omeostasi nell'ambiente circostante la lesione, con la formazione di un ematoma e del relativo coagulo, a limitare così l'eventuale emorragia. Inoltre, in questo processo, vengono rilasciati anche fattori biochimici (come TGF- β e VEGF) che attirano per chemiotassi le cellule specializzate nelle successive fasi e sono in grado di aumentare la vasodilatazione e la permeabilità dei vasi adiacenti.

In seguito, durante l'infiammazione, confluiscano nel sito leso anche molecole proteiche (quali BMPs, IL-1 e TNF- α) e leucociti deputati all'eliminazione del tessuto necrotico, detriti cellulari e tessutali, e agenti patogeni, in modo da ripulire il tessuto danneggiato per facilitarne poi la guarigione. Sebbene le prime due fasi permettano la stabilizzazione delle condizioni fisiologiche locali, è solo a partire dalla terza che diventa possibile il recupero della struttura anatomica e delle proprietà meccaniche originarie. Tuttavia, in questo stadio, è doveroso fare una distinzione fra i due meccanismi di riparazione esistenti: quello primario, che riguarda le fratture ossee in cui le superfici di separazione sono a contatto o comunque vicine (meno di 0.15 mm) [15]–[17]; e quello secondario, innescato nel caso di fratture instabili e/o con una discontinuità del tessuto rilevante. Chiaramente, in linea con la tematica dell'elaborato, si tratta solo quest'ultimo caso.

Nel meccanismo di riparazione secondaria, grazie all'effetto angiogenico del VEGF, si ha un iniziale arrivo delle MSCs verso la zona designata, seguito poi dalla loro differenziazione in condroblasti e fibroblasti. Infatti, la gravità della lesione impedisce una diretta formazione del tessuto osseo nella zona lesionata (quindi gli osteoblasti non sono immediatamente essenziali) e pertanto si ha una prima stabilizzazione mediante la deposizione di un tessuto di granulazione ricco di collagene. Dopo circa due settimane dalla frattura, questo callo cartilagineo subisce una graduale mineralizzazione, fino a diventare interamente tessuto osseo fibroso, che risulta essere però più debole dell'osso originale.

Infatti, è solo con l'ultima fase di rimodellamento che si può ottenere nuovamente un osso con proprietà paragonabili a quelle precedenti alla lesione. Durante questa parte conclusiva, quindi, gli osteoclasti, in collaborazione con gli osteoblasti, agiscono eliminando il tessuto osseo fibroso rimpiazzandolo con tessuto osseo lamellare, deposto secondo le direzioni di sollecitazione esterne.

Tuttavia, questo processo estremamente complesso può essere influenzato da alcuni fattori esterni, siano essi locali (infezioni, movimenti della zona fratturata o ridotta perfusione del tessuto) oppure sistemici (anzianità, obesità, malnutrizione, fumo, ...). D'altra parte si può promuovere la guarigione delle lesioni mediante una corretta alimentazione (ricca di calcio, proteine, vitamine C e D) e l'impiego di tecniche di trapianto finalizzate a fornire un supporto utile a supportare il tessuto osseo di nuova formazione [16], [17].

2.2 Rigenerazione tissutale indotta artificialmente

Come noto, la rigenerazione tissutale naturale nel caso dei CSD non è possibile, e, perciò, si rende necessario un intervento esterno: solo così, si possono ottenere i sei requisiti essenziali alla completa guarigione, descritti schematicamente dal cosiddetto “ideale del diamante”. Di fatto, il concetto si basa sulla necessità della presenza di due fattori strettamente dipendenti dall’organismo ospite (vascolarizzazione e assenza di patologie pregresse), a cui se ne aggiungono altri quattro correlati invece alla tecnica utilizzata (presenza di fattori biochimici osteoinduttivi, matrice osteoconduttiva, capacità osteogenetica e stabilità meccanica) [15].

2.1.1 Trapianto e composti sintetici

L’approccio più comunemente adottato per ottenere i requisiti richiesti è quella del trapianto di tessuto osseo, classificabile generalmente in: autotrapianto, allotrapianto e xenotrapianto.

Gli autotrapianti sono universalmente riconosciuti come la tecnica migliore in assoluto, essendo la più sicura da un punto di vista immunologico ed epidemiologico, oltre a godere di proprietà osteoinduttive, osteoconduttive e osteogeniche. Tuttavia, dal momento che il tessuto osseo viene estratto da siti anatomici del paziente differenti da quello lesionato, si ha un maggiore rischio di infezione, frattura ed emorragia, a cui si sommano un incremento dei tempi operatori, e dolore post-operatorio.

Pertanto, negli anni, sono stati sviluppati dispositivi e tecnologie orientate ad estrarre il maggior volume di osso da trapiantare, con il minor impatto possibile sul paziente. Fra questi il Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) ha fornito i migliori risultati, con un incremento del volume ricavato (a parità di zona anatomica), mantenimento di tutte le proprietà essenziali e un minor dolore causato, fin dai primi istanti.

L’allograpianto è invece una tipologia di trapianto in cui i donatori sono comunque individui della stessa specie, ma diversi dal ricevente. In questo caso, i vantaggi sono associati alla minor perdita ematica, al minor dolore post-operatorio e alla maggior quantità di tessuto prelevata, associati però ad un alto costo, rischio immunologico ed epidemiologico e perdita della capacità osteogenica.

In queste due categorie si possono poi distinguere i trapianti di osso corticale, tecnica che consente di avere fin da subito una miglior stabilità strutturale, a discapito di una diminuzione delle altre proprietà; e di osso trabecolare, caratterizzato invece da proprietà osteogeniche, osteoconduttive e osteoinduttive più spiccate, ma con peggiori proprietà meccaniche (Figura 2.1).

Infine, gli xenotrapianti sono trapianti i cui donatori appartengono a specie diverse da quella umana, con un conseguente notevole rischio di rigetto, e pertanto nemmeno approvati dalla FDA.

In alternativa a queste tecniche tradizionali, si è cercato di sviluppare anche sostituti artificiali con capacità simili, seppur nemmeno comparabili con degli autotrapianti. Questo è il caso dei materiali ceramici (solfati di calcio, fosfati di calcio come fosfato tricalcico e HA), con ottime proprietà meccaniche, ma pressoché privi delle altre; e delle BMPs spesso combinate con le tecniche di trapianto sopracitate, ma con risultati contrastanti negli studi.

Infine, un'ultima tecnica degna di nota prevede l'impiego di matrice extracellulare demineralizzata (DBM), con scarse proprietà meccaniche, ma buona osteoconduttività e osteoinduttività. Questa, arricchita di fattori biochimici, ha riscontrato particolare successo, arrivando a ricoprire negli USA una quota di mercato pari addirittura al 50% di tutti gli allotrapianti. Concludendo, quindi, la tecnica impiegata dipende dal singolo caso clinico e dalle preferenze del chirurgo [2], [3], [12], [16]–[18].

	Osteoconductive	Osteoinductive	Osteogenic	Structural	Costs	Disadvantages
Autograft						
Cancellous	+++	+++	+++	+	-	Donor site morbidity, increased OR time, increased blood loss
Cortical	+	+	+	+++	-	as above
Vascularize bone	++	+	++	+++	-	as above
Bone marrow aspirate	+/-	++	+++	-	-	as above
Platelet-rich plasma	-	+++	-	-	- ^a	Controversial, unproven efficacy
Allograft						
Cancellous	+	+/- ^b	-	+	\$376/30cc ^c	Potential infection transmission, no osteogenic potential, potential host rejection
Cortical	+	+/- ^d	-	+++	\$530–1,681/3–20 cm ^e	as above
DBM	+	++	-	-	\$726–1,225/10 mL ^f	No structural properties, potential host rejection
Synthetic ceramics						
Calcium sulfate	+	-	-	++	\$655/10 mL ^g	Rapid resorption (faster than bone growth), osteoconductive properties only
Calcium phosphate	+	-	-	+++	\$1,520/10 mL ^g	Osteoconductive properties only
Tricalcium phosphate	+	-	-	++	\$875/10 mL ^g	Osteoconductive properties only
Other						
rhBMPs	+/- ^e	+	+	-	\$3,500–5,000 ^e	Expensive, limited FDA approval, limited indications, increasing evidence of neurovascular complications when used in the spine

^aExcludes preparation costs; ^b+, typically with fresh allografts; -, typically with frozen-preserved allografts; ^cCancellous chips/freeze dried \$376/30 mL;²⁵ ^d+, typically with fresh allografts; -, typically with frozen-preserved allografts; ^efor femoral shaft allograft 3–20 cm \$530–1,681;²⁵ ^fGrafton/Allomatrix;²⁵ ^gprices are based on the ASP for several market leaders of such pure products: calcium sulfate (Osteoset, Wright), calcium phosphate (CopiOs, Zimmer Spine), β-tricalcium phosphate [Vitoss (standard morsels canisters), Orthovita]; ^h+ when delivered via collagen-based carriers; ⁱOP-1 (Stryker) \$5,000;²⁵ Infuse (Medtronic-Sofamor Danek) \$3,500–4,900, small–large.

Figura 2.1: descrizione schematica delle principali modalità di trapianto e dei sostituti ossei, con proprietà principali e relativi costi.

2.1.2 *Induced Membrane Technique*

A fianco al trapianto tradizionalmente inteso, altri trattamenti sono stati testati e validati. Fra questi rientra la tecnica di Masquelet, anche conosciuta come tecnica della membrana indotta. Questo approccio si è rivelato particolarmente utile nel caso in cui i CSD presentino dimensioni maggiori di 5 cm, ove il trapianto autologo dimostra meno efficacia, e si articola in due fasi distinte. Nella prima fase viene posto del PMMA come riempitivo del difetto osseo (eventualmente impregnato di antibiotici) e lasciato all'interno dell'organismo ospite per circa 6-8 settimane. Solo a questo punto, quando il cemento osseo ha indotto la formazione di una membrana fibrosa altamente vascolarizzata intorno a sé, il PMMA viene rimosso e sostituito con tessuto osseo trapiantato. Quest'ultimo, infine, favorito dalla elevata vascolarizzazione della membrana fibrosa, ricostituisce l'osso originario mediante ossificazione intramembranosa (Figura 2.2).

Il vantaggio di questo metodo si basa soprattutto sul fatto che viene creato un apposito compartimento isolato con elevate capacità trofiche e osteoinduttive, al cui interno si va poi a riformare il tessuto osseo. Ciò promuove inoltre il rimodellamento e il rafforzamento del tessuto di nuova formazione. Il tempo medio di guarigione è di circa 6 mesi.

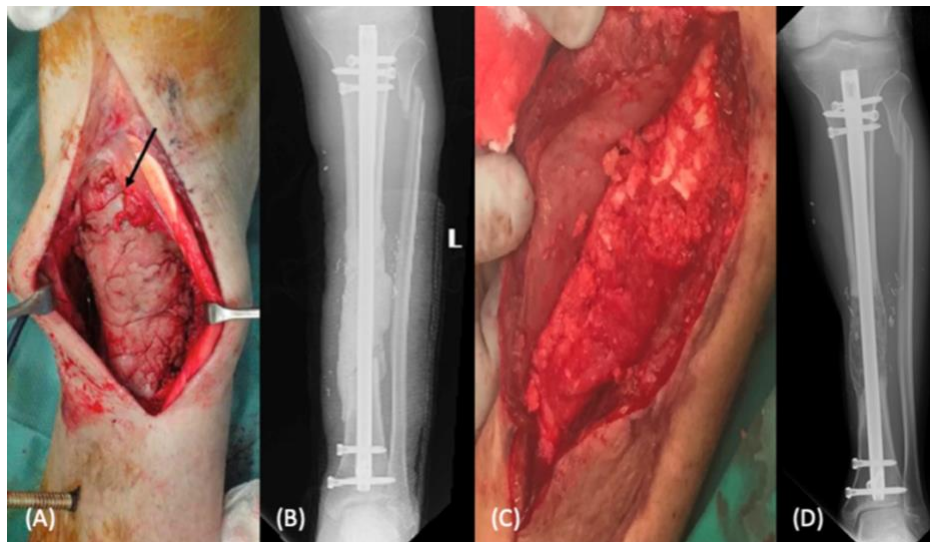


Figura 2.2: tecnica della membrana indotta applicata ad un difetto tibiale. Le foto illustrano: la prima operazione in cui viene posizionato il cemento riempitivo caricato con antibiotici (A), e la relativa radiografia (B); seguita dal secondo intervento in cui il cemento osseo è stato sostituito con un trapianto osseo autologo (C) e la relativa radiografia (D).

2.1.3 *Distrazione osteogenetica*

Una modalità alternativa a quelle presentate, ma comunque molto efficace, è la distrazione osteogenetica, anche detta tecnica di Ilizarov, dal nome del suo ideatore. In questo caso, il chirurgo procede con l'asportazione di una porzione di tessuto sano dalla metafisi ossea, inserendolo all'interno della zona lesionata. Su questa parte di tessuto sano, dopo circa 10 giorni dalla corticotomia, si applicano le sollecitazioni meccaniche in maniera controllata (rateo: 1-2 mm/giorno)

mediante un fissatore esterno (o di un'asta intramidollare). Questo permette il graduale trasporto meccanico del tessuto inserito verso le estremità illese più vicine alla cavità del CSD, stimolando inoltre sia l'ossificazione intramembranosa, sia quella endocondrale. Alla fine, una volta che il tessuto osseo appena formato viene a contatto con le estremità precedentemente integre, si comprime il segmento distale così da favorire l'ancoraggio e la completa guarigione (Figura 2.3).

Sfruttando questo approccio si ha il beneficio di poter iniziare a supportare carichi già dalla fase iniziale, a cui corrisponde però un costante rischio di infezioni dovute alle viti del fissatore, fratture nel segmento di nuova formazione, rottura delle viti stesse a cui si sommano altre complicanze minori.

Il tempo medio di guarigione è di 6 - 12 mesi.

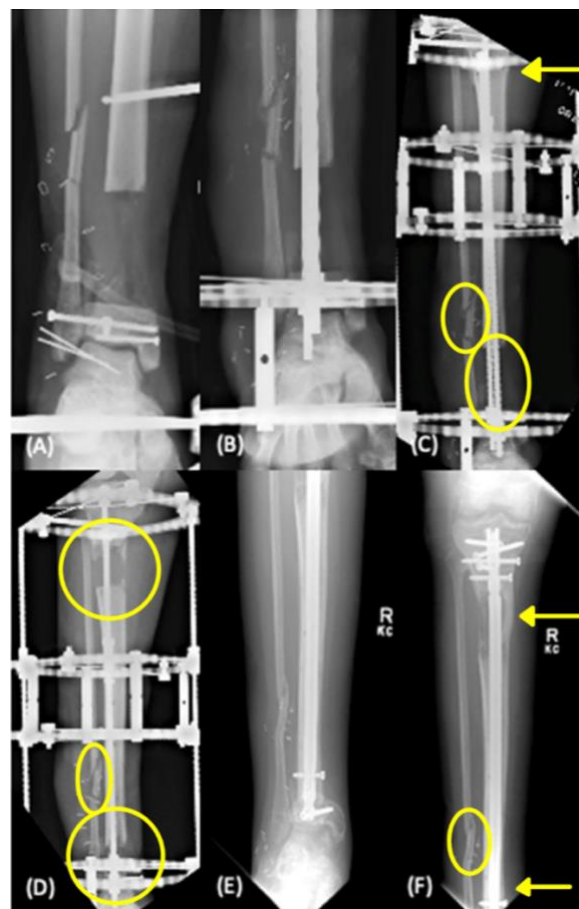


Figura 2.3: tecnica di Ilizarov applicata ad un difetto della metafisi tibiale. Alla pulizia della lesione dai detriti e al fissaggio temporaneo (A) seguono la corticotomia della tibia prossimale e il posizionamento dell'asta intramidollare e del fissatore esterno circolare (B, C). Dai controlli nel periodo successivo si osserva il trasporto osseo dalla zona prossimale a quella distale (D) e, infine, dopo il congiungimento istologico di ambo i lati, la rimozione del fissatore esterno (E, F). In giallo si evidenziano i progressi compiuti a partire dalla situazione iniziale, fino a quella finale.

Al termine di questa panoramica sulla rigenerazione ossea, si riportano i dati percentuali relativi al successo e alle complicazioni associate alle singole tecniche.

La difficoltà principale nella valutazione dell'efficacia delle diverse modalità di trattamento è dovuta sia alle sensibili differenze fra i dati statistici ricavati (Tabella 2.1, Tabella 2.2, Tabella 2.3), sia alla mancanza di dati qualitativi relativi alle modalità di conduzione degli studi (come confronti diretti fra

le varie metodologie o eventuali bias omessi). Inoltre, a tutto ciò si aggiungono l'esiguo numero di pazienti coinvolti e la sostanziale diversità fra i casi clinici di CSD (dimensioni, siti anatomici, ...). Oltre alle tabelle, si ritiene particolarmente interessante anche l'inserimento di grafici di comparazione (Figura 2.4 e Figura 2.5) per confrontare le modalità di trattamento dei CSD, nei casi di infezioni correlate alle fratture (FRI) [2], [13], [14], [18].

Fonte	Autotrapianto	Allotrapianto	Ilizarov	Masquelet
[2]	-	-	94 %	88-100 % ^a ----- 82.3 %
[12]	-	81% (sopravvivenza) ^b	95 % (range: 60 - 100%)	88-100 % ^a Valide per traumi, più basse nel trattamento di tumori
[16]	80% da cresta iliaca 90% mediante RIA ----- 86% da cresta iliaca ^d 82% mediante RIA ^d	-	-	-

Tabella 2.1: percentuali di unione delle varie tecniche.

^a stesso studio; ^b studio su pazienti oncologici con allotrapianto di osso trabecolare; ^c stesso studio; ^d stesso studio;

Fonte	Autotrapianto	Allotrapianto	Ilizarov	Masquelet
[2]	-	-	5 % nuova frattura 2.2 % complicazioni neuro vascolari	-
[12]	20 % RIA: 6 %	75 % mancate unioni ^b 13 % nuova frattura ^b 16 % infezioni ^b	-	16.1-50 % 4-35 % nuova operazione
[16]	8.6 % maggiori 20.6 % minori RIA: 2% ----- 12.4 % infezioni ^c ----- 8 % da cresta iliaca ^d 8 % mediante RIA ^d ----- 19 % da cresta iliaca 6 % mediante RIA	- ----- 26.3 % infezioni ^c	-	-

Tabella 2.2: incidenza delle complicazioni nelle varie tecniche

^a stesso studio; ^b studio su pazienti oncologici con allotrapianto di osso trabecolare; ^c stesso studio; ^d stesso studio;

Fonte	Autotrapianto	Allotrapianto	Ilizarov	Masquelet
[2]	-	-	2.9 %	-
[12]	-	-	2.6 %	-
[16]	-	-	-	-

Tabella 2.3: incidenza delle amputazioni nelle varie tecniche.

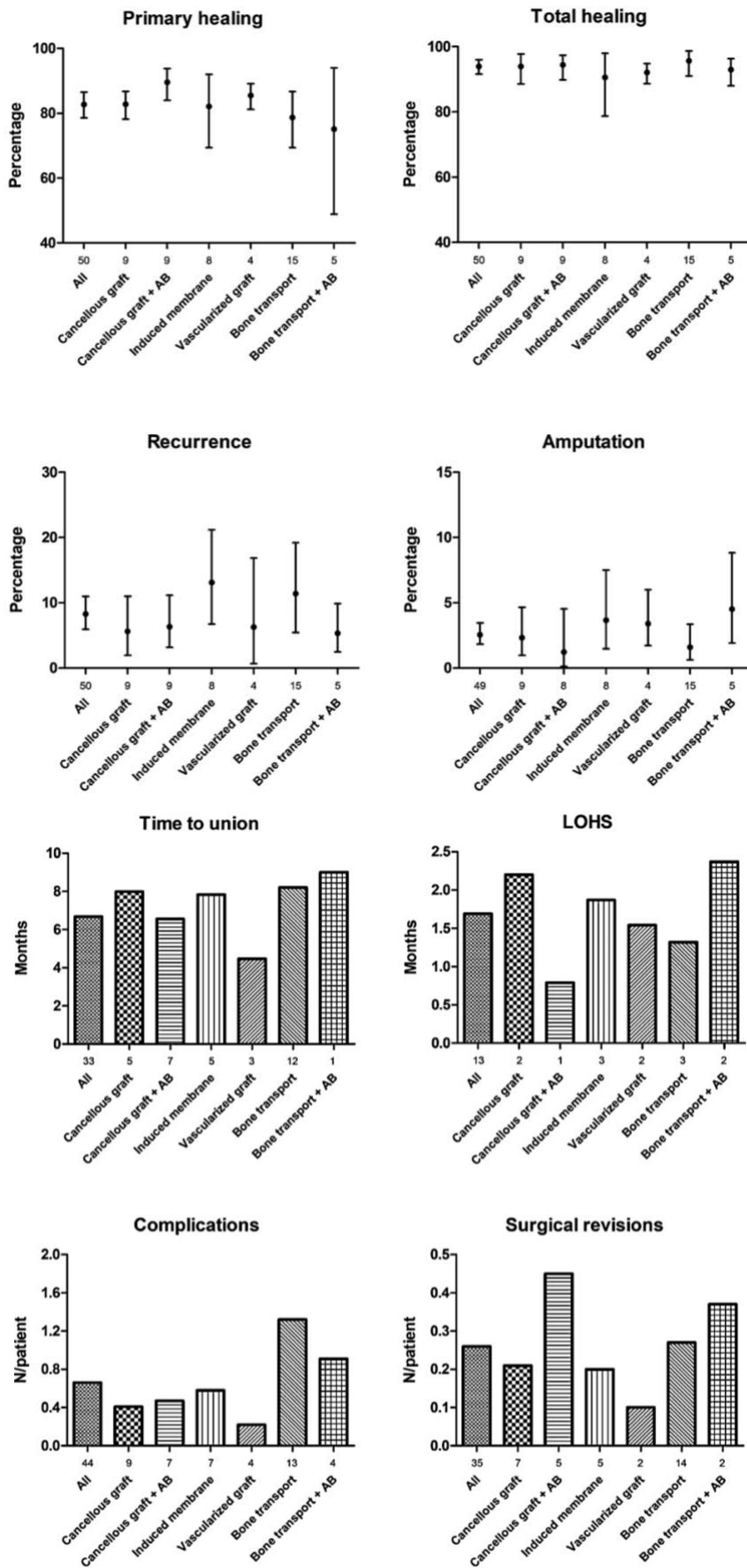


Figure 2.4 e 2.5: esito clinico dei vari approcci nel trattamento delle FRI.

I numeri posti sull'asse delle ascisse indicano il numero di studi da cui sono stati estratti i dati. AB indica l'impiego di antibiotici locali; LOHS indica la lunghezza della durata dell'ospedalizzazione.

Capitolo 3: Stampa 3D: preparazione e tecnologie

Nata nel 1986 e da allora sviluppata con un grande sforzo interdisciplinare, fra miglioramenti software, hardware e dei materiali impiegati, la stampa 3D si è rivelata una tecnologia pionieristica in innumerevoli ambiti, compreso quello biomedico [21]. Nello specifico, si tratta di una tecnica di produzione additiva (in inglese: “Additive Manufacturing”, o più semplicemente AM) in cui i materiali vengono depositati strato su strato, così da realizzare oggetti concreti a partire da modelli tridimensionali virtuali. In particolare, ne esistono due varianti nell’ambito medico:

- la stampa 3D (cell-free printing), che permette la produzione di manufatti con il solo utilizzo di biomateriali, senza alcuna componente cellulare (replacement);
- il 3D bioprinting (cell-laden bioprinting), che permette la produzione di scaffold, realizzati con biomateriali, al cui interno sono disperse cellule e biomolecole (regeneration) [22].

Si introduce inoltre un ultimo concetto, che di recente sta acquisendo maggiore importanza nell’ambito della chirurgia orale e cranio-maxillofacciale (CMF), ossia il Point-of-care 3DP (POC 3DP). Questa procedura prevede la creazione di dispositivi medici stampati in 3D, su misura per il paziente (modelli anatomici, strumenti chirurgici, ...), nella medesima struttura sanitaria o in una ad essa affiliata. Chiaramente ciò richiede che tutta la strumentazione e il personale qualificato alla creazione e stampa dei modelli sia presente e disponibile in loco.

Il fine ultimo di queste tecniche consiste nel ricreare un tessuto biomimetico/organo funzionante in grado di integrarsi con i tessuti sani e sopperire alla carenza di donatori bio- e immuno-compatibili. Tuttavia, seppure questo traguardo sia ancora molto lontano, soprattutto per quanto concerne il bioprinting, si possono già apprezzare i sostanziali vantaggi che 3DP e bioprinting apporterebbero.

Infatti, rispetto alle tecniche tradizionali, la stampa 3D permette di:

- realizzare qualunque geometria macroscopica e microscopica, su misura per il paziente;
- godere di elevata accuratezza nella produzione e ridurre il numero di cicli produttivi;
- limitare gli scarti, mantenendo un basso costo per unità prodotta;
- ridurre il tempo necessario alla produzione e all’impianto nel sito anatomico (ossia il tempo trascorso in sala operatoria), abbattendo così anche i costi del personale;

mentre, nel caso della tecnologia del bioprinting (oltre ai benefici sopra citati) sarebbe possibile:

- coltivare più linee cellulari contemporaneamente, con un alto tasso di sopravvivenza;
- avere un tessuto capace di integrarsi completamente, auto-rigenerarsi, mantenere la perfusione ematica e adattarsi in risposta agli stimoli esterni;
- avere una miglior distribuzione di cellule, biomolecole e fattori di crescita nello scaffold (poiché verrebbero dispersi in tutto il volume e non solo superficialmente) [21], [23]–[26].

Questi vantaggi offerti dai dispositivi (o dagli eventuali tessuti) stampati in 3D riscontrano particolare interesse nel caso dei CSD, in quanto una loro opportuna progettazione e produzione permetterebbe un'adeguata stabilità primaria e secondaria. Infatti, la complementarità geometrica del prodotto con la zona anatomica di interesse garantirebbe fin da subito la stabilità meccanica dell'impianto (stabilità primaria); mentre l'osteointegrazione (stabilità secondaria), sarebbe associata all'osteoinduttività e osteoconduttività dello scaffold, favorite dalla presenza di porosità, rugosità ed eventuali cellule o biomolecole (facilmente distribuibili con regolarità e accuratezza).

Infine, si elencano anche gli svantaggi che la stampa 3D presenta:

- elevato costo complessivo (strumentazione hardware, software, personale qualificato e manutenzione);
- impossibilità di utilizzo in medicina d'urgenza (manca il tempo necessario alla progettazione e produzione);
- le tecniche di imaging per la ricostruzione del modello anatomico necessitano di una durata prolungata per ottenere qualità maggiore (MRI), sfruttano radiazioni ionizzanti non compatibili con donne in gravidanza o nella fase di allattamento (CT), oppure hanno risoluzione inferiore rispetto a quelle appena menzionate (US);
- notevole propagazione degli errori (la qualità dei prodotti finali e la buona riuscita degli interventi dipendono strettamente da imaging accurato e corretta ricostruzione del modello 3D);
- è spesso richiesto un abbondante lavoro di processamento delle immagini post-acquisizione per ottenere un modello anatomico il più fedele possibile alla realtà;
- non tutti i biomateriali sono compatibili con la stampa 3D;
- non tutte le tecniche di stampa 3D sono compatibili con il bioprinting;
- è necessario utilizzare esclusivamente software e hardware con certificazione CE (dal 2020 in tutta l'area UE);
- assenza di procedure di verifica di sicurezza ed efficacia clinica e di protocolli standard per l'AM (e in particolare del POC 3DP) [21], [26]–[30].

3.1 Progettazione del modello 3D: requisiti essenziali

Partendo da queste considerazioni, si può proseguire con la descrizione del processo di progettazione del modello tridimensionale. Per ottenere un sostituto osseo su misura, tramite AM, sono necessari tre stadi principali:

- 1) scansione del sito anatomico patologico;
- 2) ricostruzione virtuale tridimensionale del modello reale (CAD/CAM design);
- 3) stampa 3D del sostituto osseo;

e, dato che ognuno di essi riveste un ruolo fondamentale nella buona riuscita del prodotto finale, devono essere accuratamente ottimizzati a seconda del paziente, della patologia e delle tecniche adoperate [26]. Inoltre, ai fini della corretta realizzazione dello scaffold, è necessario illustrare sinteticamente i requisiti essenziali che esso deve avere (Tabella 3.1), e di cui si deve tenere conto nella progettazione, con particolare attenzione al caso dei CSD.

Morfologici e strutturali	Fisico-chimici	Biologici
<ul style="list-style-type: none"> - Complementarità geometrica macroscopica - Rugosità superficiale (18 - 187 nm; ideale: 0.15 μm) - Porosità con elevata area superficiale (>300 μm) - Interconnessione fra pori - Modulo elastico (indicativamente compreso fra 1.2 – 22.3 GPa) - Rigidezza e durezza simili al tessuto - Curvatura locale superficie 	<ul style="list-style-type: none"> - Composizione stechiometrica e microstruttura cristallina simili al tessuto - Cinetica di degradazione controllata, e coordinata alla formazione del nuovo tessuto - Degradazione scaffold deve produrre ioni alcalini (es. Na^+, Ca^{2+}) - Eventuale capacità di drug delivery - Superficie idrofilica e carica 	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatibilità - Immunocompatibilità - Resistenza a sterilizzazione - Bioattività - Biorisorbibilità (desiderata) - Proprietà antimicrobiche (desiderate) - Equa distribuzione cellulare in tutto il volume (bioprinting) - Materiali con approvazione CE e/o FDA

Tabella 3.1: requisiti di uno scaffold per il trattamento di CSD [5], [11], [24]–[26], [31], [32].

Da questi dipendono strettamente la corretta adesione, crescita, proliferazione e sopravvivenza cellulare, da cui deriva di fatto l'osteointegrazione. L'ideale sarebbe replicare il valore di ogni proprietà del tessuto osseo, ma, essendo un obiettivo oggettivamente irrealizzabile, ci si limita a fissare un range di valori, tali per cui si possano evitare fenomeni di riassorbimento osseo, mancata adesione cellulare o sopravvivenza, stress shielding, biotossicità o rottura sotto stress.

Nel dettaglio, se il modulo elastico risulta essere fuori dall'intervallo indicato, si osserva la differenziazione delle MSCs in linee cellulari diverse dagli osteoblasti; per cambiamenti di porosità e interconnessioni si ha l'alterazione della velocità del rilascio di ioni, adesione cellulare, crescita e differenziazione; variazioni nella cinetica di degradazione possono causare il distacco dell'impianto dal sito di innesto; infine, il rilascio di ioni non alcalini impedisce la formazione di un'interfaccia di contatto analoga a quella ossea, alterando anche il pH locale [24], [25], [28], [32], [33].

3.2 Realizzazione del modello 3D

La completa realizzazione del modello virtuale dello scaffold si ottiene solo successivamente alla scansione del sito anatomico (punto 1) e alla processazione delle immagini (punto 2).

3.2.1 Scansione della regione anatomica

Innanzitutto, per la scansione del sito anatomico si possono sfruttare le tecniche di imaging strutturale di risonanza magnetica (MRI), tomografia assiale computerizzata (CT), oppure ultrasuoni (US). Altre tecniche, come quelle derivanti dalla medicina nucleare (SPECT e PET), possono essere combinate alle precedenti per ottenere anche una componente di imaging funzionale, ma non sono strettamente necessarie. Si preferisce non approfondire in questa sede tecniche quali μ MRI o μ CT rispettivamente perché lunghe e molto costose o per la piccola regione scansionabile.

Le principali tecniche di imaging sono elencate in Figura 3.1 che però è carente di alcuni parametri rilevanti. Infatti, la MRI raggiunge la massima risoluzione indicata se viene applicato un campo magnetico uniforme a 3T (con tempo di scansione riportato in Figura 3.1) così da ottenere un buon compromesso fra risoluzione, tempo di scansione ed effetti indesiderati sul paziente (quali vertigini e malessere). Si ricorda inoltre l'impossibilità di sottoporre a questa tecnica pazienti con impianti metallici e si sconsigliano lunghi tempi di scansione per pazienti ansiosi e claustrofobici o l'utilizzo di campi magnetici di intensità maggiori a 7 - 9 T, per chiunque.

Modality	Resolution	Scan time	Maximum volume	Preferred tissue types	Advantages	Disadvantages
MRI	250×250×500 μ m	5–40 min	Human body	Soft and hard tissue (bone)	<ul style="list-style-type: none"> ● No risk of radiation exposure ● Enables imaging of moving components in the body in 4D such as heart contractions 	<ul style="list-style-type: none"> ● Intolerant of in-vivo medical implants and body motions during scanning process ● Requires longer scan times for better quality images ● Patients may experience anxiety and claustrophobia
μMRI	5–200 μ m	6–24 h	Full body	Soft and hard tissue (bone)	<ul style="list-style-type: none"> ● No risk of radiation exposure ● Enables incorporation of contrast agents for molecular imaging ● Enables real time imaging 	<ul style="list-style-type: none"> ● High cost ● Low portability ● Longer scan times
CT	0.24–0.33 mm	5 min (8–40 s of actual scan time)	Human body	Hard tissue (bone)	<ul style="list-style-type: none"> ● Tolerant of in-vivo medical implants (i.e., metallic or with battery) ● High resolution imaging of various tissue types ● More tolerant of patient movement during scanning process 	<ul style="list-style-type: none"> ● Radiation exposure limits exposure level and frequency; not recommended for pregnant or breast-feeding women ● May compromise immune system in children ● Iodine contrast material can generate allergic reaction
μCT	1–200 μ m	2–4 h	Whole rat	Hard tissue (bone)	<ul style="list-style-type: none"> ● High resolution 	<ul style="list-style-type: none"> ● Radiation exposure limits exposure level and frequency
Ultrasound	1×1.5×0.2 mm	10–15 min	Neonatal, blood vessels	All tissue types	<ul style="list-style-type: none"> ● Enables real-time images of moving components ● Easy to operate and does not involve radiation 	<ul style="list-style-type: none"> ● Image quality inferior to other modalities ● Cannot detect all abnormalities and melanomas

Figura 3.1: tecniche di imaging a confronto [26].

Anche la CT assicura una certa flessibilità sulle tecniche utilizzabili (3° generazione, 4° generazione, CT elicoidale e MDCT) permettendo di godere addirittura di risoluzione maggiore, minor tempo di scansione e maggior facilità nella ricostruzione rispetto alla MRI, seppur impieghi radiazioni ionizzanti a cui solo alcuni pazienti possono essere esposti (p. es., si escludono le donne in gravidanza), a dosi e frequenze controllate. Inoltre, è possibile ridurre l'artefatto di volume parziale (PVE) con l'uso di slice aventi spessore minore di 1 mm e voxel isotropi. Per le strumentazioni rotanti che permettono di effettuare scansioni a 360°, l'incremento angolare va da 0.25° a 1°, producendo così 360 - 1440 immagini. Il principale limite dell'accuratezza complessiva resta però legato allo spessore delle slice.

Infine, l'imaging US viene utilizzato solo in rari casi, come ad esempio per l'analisi dell'integrazione dello scaffold impiantato, con la finalità di controllare la perfusione tissutale.

La larga varietà di tecniche di imaging, dei relativi parametri e degli agenti di contrasto impiegabili rende la ricostruzione delle immagini particolarmente ostica e poco uniforme, soprattutto data l'assenza di protocolli standard validati. Ad ogni modo, da questa fase si ottengono generalmente solo file in formato TIFF (Tagged Image File Format) o DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) [26], [27], [29], [34].

3.2.2 *Processazione delle immagini: segmentazione*

Successivamente alla scansione delle zone anatomiche di interesse, si procede all'importazione e all'elaborazione delle immagini. In tal senso il formato DICOM, standard creato appositamente per le applicazioni di tipo medico, offre un enorme vantaggio, essendo stato sviluppato per migliorare l'interoperabilità fra sistemi diversi, facilitando quindi archiviazione, trasmissione, distribuzione e stampa di file. Inoltre, al suo interno incorpora sia gli effettivi dati dell'immagine (numeri interi corrispondenti ai valori dei pixel; in scala di grigio per CT e MRI) sia i metadati, contenenti informazioni descrittive dell'immagine, inerenti al paziente e relative alla tecnica di imaging e al suo settaggio. In questo modo, l'immagine risulta auto descrittiva, facilmente ritrovabile in caso di studi su più soggetti e completa di informazioni [26], [35], [36].

L'effettiva ricostruzione della morfologia dell'osso parte quindi dalla conversione e dall'elaborazione dei file DICOM mediante l'ausilio di software. Si noti che questi possono essere usati nell'Unione Europea solo previa certificazione CE e, per questa ragione, nella seguente trattazione si limitano i riferimenti esclusivamente ai software commerciali dotati di tale requisito (negli USA è invece necessaria l'approvazione FDA) [30], [37].

Solitamente, dopo l'importazione dei file DICOM si procede con la segmentazione, ossia il partizionamento dell'immagine in regioni di interesse (ROI), corrispondenti alle strutture anatomiche. Questo può essere fatto secondo differenti modalità, ciascuna con i propri vantaggi e svantaggi.

Fra le principali modalità di segmentazione delle immagini, il global thresholding è un metodo semi-automatizzato in cui, fissato un valore soglia t , si verifica se il valore della scala di grigio associato a ciascun pixel ($I_{x,y}$) sia maggiore o uguale del limite stabilito: se così è, allora questo entra a far parte della regione di interesse, mediante l'ausilio di una maschera binaria $M_{x,y}$.

$$M_{x,y} = \begin{cases} 1 & I_{x,y} \geq t \\ 0 & I_{x,y} < t \end{cases}$$

Il local thresholding si basa sul medesimo concetto, ma divide l'immagine in più ROIs grazie alla selezione di molteplici valori di soglia ($t_1, t_2, \dots, t_k, t_{k+1}$). Così facendo si aumenta l'accuratezza nel delineare i bordi dei tessuti e si riducono gli errori dovuti ad artefatti di volume parziale, principalmente localizzabili nei pressi dei bordi dei segmenti ossei (ove sono presenti più tipologie di tessuto e quindi risulta complesso delineare una netta separazione dell'osso dalla zona circostante):

$$M_{x,y} = \begin{cases} 0 & I_{x,y} \leq t_1 \\ 1 & t_1 < I_{x,y} \leq t_2 \\ 2 & t_2 < I_{x,y} \leq t_3 \\ \dots & \dots \\ k & t_k < I_{x,y} \leq t_{k+1} \\ 0 & I_{x,y} > t_{k+1} \end{cases}$$

L'edge detection invece, basandosi sulla discontinuità dell'immagine, identifica i bordi interni ad essa calcolando il gradiente dei valori di grigio presenti e confrontandolo poi con un valore soglia. Tuttavia, seppure il risultato di questo metodo possa essere pesantemente alterato da rumore e altri artefatti (erroneamente identificati come bordi), risulta vantaggioso per le strutture con contrasto diverso in regioni diverse (es. ossa lunghe).

Infine, nel caso del region growing si sceglie manualmente un voxel da usare come punto di riferimento per identificare il tessuto di interesse, a cui si confrontano i valori di grigio dei pixel (ad esso adiacenti) che soddisfano il criterio di omogeneità. La ROI viene quindi definita dall'insieme dei pixel che verificano tali condizioni e quindi sono tutti connessi fra loro. Lo svantaggio principale risiede nel fatto che ogni struttura ossea separata richiede di identificare manualmente uno specifico e differente punto di riferimento (scomodo nel caso di fratture complesse) e inoltre il rumore e il PVE possono causare erronee corrispondenze o vuoti. L'immagine complessiva I risulta essere quindi il risultato dell'unione di una pluralità di regioni di interesse R_i :

$$R_1 \cup R_2 \cup \dots \cup R_i = I$$

A fianco di questi metodi, ne esistono altri attualmente impiegati che si basano su ripetuti calcoli computazionali (clustering segmentation), sull'identificazione manuale dei contorni (livewire

segmentation) oppure su un dataset di immagini da cui i modelli statistici traggono spunto per identificare le varie forme (Statistical Shape Model (SSM) segmentation). Tuttavia, gli approcci più semplici e diffusi risultano essere quelli sopra elencati e, sebbene negli ultimi anni i metodi SSM si siano particolarmente sviluppati, rimangono inadatti nei casi clinici di CSD poiché incapaci di identificare strutture anatomiche molto diverse dalle immagini presenti nei dataset (come nel caso di fratture particolarmente complesse).

Dunque, nelle applicazioni pratiche, oltre all'intervento manuale di personale qualificato, si adottano più metodi combinati, così da migliorare l'accuratezza di questo processo e di conseguenza anche il risultato finale. Ad ogni modo, pur non essendo stato delineato un protocollo standard, secondo alcuni studi, in generale, l'accuratezza media di questa fase risulta essere pari a $0.73 \text{ mm} \pm 0.36 \text{ mm}$ [27], [30], [35].

3.2.3 *Processazione delle immagini: modifica e preparazione alla stampa*

Identificate le regioni di interesse con il processo di segmentazione, tramite i software viene creata una mesh del modello 3D a cui segue l'esportazione del file in formato STL (Standard Triangulation Language), VRML (Virtual Reality Modeling Language) oppure X3D (Extensible 3D). Questi, usati per rappresentare la superficie del modello, costituiscono la base di lavoro dei software CAD/CAM (Computer Aided Design / Computer Aided Manufacturing) che permettono rispettivamente aggiustamenti e modifiche al modello virtuale e la realizzazione di codice numerico CNC (Computer Numerical Control), basato sul modello 3D, per guidare la stampante nel processo di stampa in maniera automatizzata (solitamente sotto forma di istruzioni in G-code).

Nell'utilizzo di software CAD/CAM (come 3-Matic (Materialize) e NX (Siemens PLM Software)) si opera principalmente con tre modalità distinte:

- Constructive Solid Geometry (CSG) si basa su solidi primitivi e operatori booleani (unione, intersezione, differenza) e permette di realizzare geometrie complesse.
Particolarmente dispendiosa a livello computazionale e di spazio occupato;
- Spatial Occupancy Enumeration (SOE) si basa sulla combinazione di blocchi finiti (come elementi cubici) e permette di rappresentare solidi complessi.
Particolarmente dispendiosa a livello computazionale e di spazio occupato;
- Boundary representation (B-Rep) si basa sull'uso di elementi di confine (vertici, bordi, facce) e permette di delineare oggetti chiusi, anche se non complessi come in CSG e SOE.

Inoltre, in questa fase, oltre a poter creare nel modello le porosità desiderate mediante la sottrazione di geometrie particolari, possono anche essere effettuati test virtuali per determinare le proprietà

meccaniche e dei flussi di fluido mediante analisi FEM (Finite Element Method), sui punti discreti identificati dalla mesh.

Nonostante la complessità e il continuo sviluppo di questo processo permangono però tuttora degli ostacoli irrisolti:

- la conversione da DICOM al modello tridimensionale (e soprattutto la fase della segmentazione) determina la maggior perdita di accuratezza in tutto il processo;
- l'elevata mole di lavoro per la post-elaborazione delle immagini, necessaria ad incrementare l'accuratezza del modello virtuale (tempo medio 4.44h, con punte di 30h [21]);
- la difficoltà o l'impossibilità di modellare strutture multiscala e/o composte più materiali diversi (similmente a quelle naturali);
- la bassa efficienza e performance dei sistemi CAD/CAM nella progettazione di strutture biomimetiche porose;
- per la creazione di modelli 3D di organi complessi non è sufficiente solamente la scansione strutturale della morfologia esterna, ma tramite modelli matematici, modellazione CAD e reverse engineering, sarebbe fondamentale ricostruire anche la struttura interna (a livello cellulare e istologico);
- la necessità di determinare la minima qualità sufficiente tale da garantire sicurezza e buoni risultati per il bioprinting (con eventuali risvolti legali) [25]–[27].

Infine, nelle Figure 3.2 e 3.3 si presentano le prestazioni medie dei vari software commerciali. Per motivi di sintesi, si omettono i requisiti minimi richiesti ai computer per l'utilizzo di questi software (che possono però essere ritrovati alla fonte [30]) e la lista di tutti i software (freeware, commerciali e di ricerca) attualmente disponibili per il 3DP e il bioprinting (indicati alla fonte [25]).

	Mimics (v.24.0)	Amira (v. 2019.4)	D2P (v. 1.0.2.2055)	Simpleware (v. 2021.06)	Segment 3D Print (v3.3 R 9056)
Time to import [s]	1.4 ± 0.5 (1–2)	2.4 ± 1.5 (1–5)	2.1 ± 0.3 (2–3)	2.5 ± 0.7 (1–4)	3.7 ± 1.1 (2–6)
Time to create the model [s]	5.8 ± 3.9 (2–14)	2.1 ± 0.4 (2–3)	11.1 ± 4.3 (4–19)	5.2 ± 2.4 (3–10)	23.9 ± 13.3 (9–55)
Number of triangles	849,995 ± 633,670 (203,616–2,219,446)	1,782,831.6 ± 1,145,476 (532,574–3,843,000)	1,752,240 ± 1,120,912 (526,460–3,764,380)	1,796,269 ± 1,132,502 (568,436–3,834,908)	1,816,860 ± 1,107,694 (576,532–4,200,338)
File size [megabytes]	76.0 ± 48.8 (23.9–163)	84.8 ± 54.5 (25.3–183)	83.4 ± 53.3 (25.1–179)	85.5 ± 53.9 (27.1–182)	86.5 ± 52.7 (27.4–200)
Number of triangles per MByte	10,433.4 ± 2111.5 (6650–13616)	21,019.2 ± 51.2 (20,973–21,165)	21,004.8 ± 32.0 (20,971–21,077)	21,003.1 ± 48.2 (20,889–21,088)	21,005.5 ± 31.1 (20,972–21,079)

Figura 3.2: prestazioni dei software commerciali riportando media ± deviazione standard, ottenute dall'analisi di 15 modelli, realizzati su 5 differenti parti anatomiche. Fra parentesi sono indicati i valori massimi e minimi. Questi valori derivano da: importazione di DICOM, segmentazione, creazione di mesh ed esportazione dei file in STL; cercando di minimizzare il più possibile le operazioni effettuate [30].

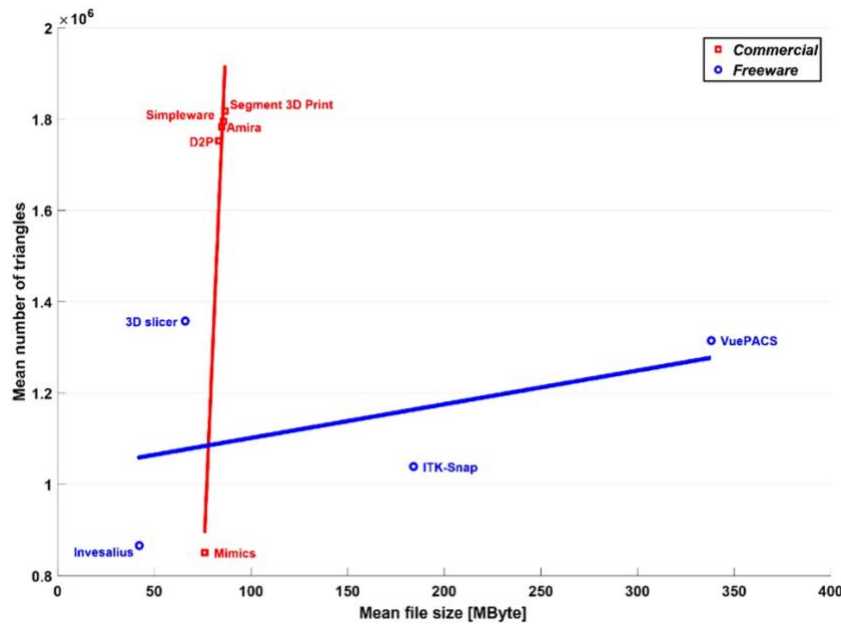


Figura 3.3: rappresentazione grafica della dimensione media dei file (in MB) contro il numero medio di triangoli della mesh di output (adimensionale) ottenuti dall'utilizzo dei vari software nell'analisi di 15 modelli, realizzati su 5 diverse parti anatomiche, cercando di minimizzare il più possibile le operazioni effettuate. Le linee rosse e blu corrispondono alla regressione lineare dei punti notevoli del grafico [30].

Chiaramente, l'estensiva trattazione del flusso di lavoro mediante software CAD è dovuta al fatto che si tratta del metodo di lavoro più diffuso. Ad ogni modo, nella Figura 3.4 si presentano anche altre modalità possibili, specifiche però per il bioprinting, con i rispettivi vantaggi e svantaggi:

Blueprint modeling techniques	Advantages	Disadvantages	Compatible bioprinting modalities
CAD-based systems	Easy to model; accurately represent simple primitive shapes	Computationally expensive; the complexity is limited to the unit cell resolution; slow processing	DBB and LBB processes based on cell transfer
Image-based systems	Directly uses medical images and eliminates their 3D segmentation; facilitates anatomical architecture;	Low accuracy; is not compatible with DBB and LBB	LBB processes based on photopolymerization
Freeform systems	Computationally efficient; facilitates heterogeneous design environment; supports geometric complexity;	Not compatible with majority of CAD software in the market	DBB, LBB and EBB
Implicit surfaces	Computationally efficient; facilitates heterogeneous design environment; support geometric complexity; generates structurally strong design models	Not compatible with majority of CAD software in the market	LBB
Space filling curves	Computationally efficient; facilitates heterogeneous design environment; supports most of 3D bioprinters and FDM-based 3D printers	Does not support geometrically complex models	EBB

Figura 3.4: confronto delle diverse tecniche esistenti per la modellazione di modelli 3D nel bioprinting. DBB: Droplet Based Bioprinting; EBB: Extrusion Based Bioprinting; LBB: Laser Based Bioprinting [26].

Infine, in Figura 3.5 sono illustrate le varie fasi della progettazione e realizzazione degli scaffold mediante additive manufacturing, con riguardo alle variabili hardware e software che influenzano l'accuratezza dei prodotti finali.

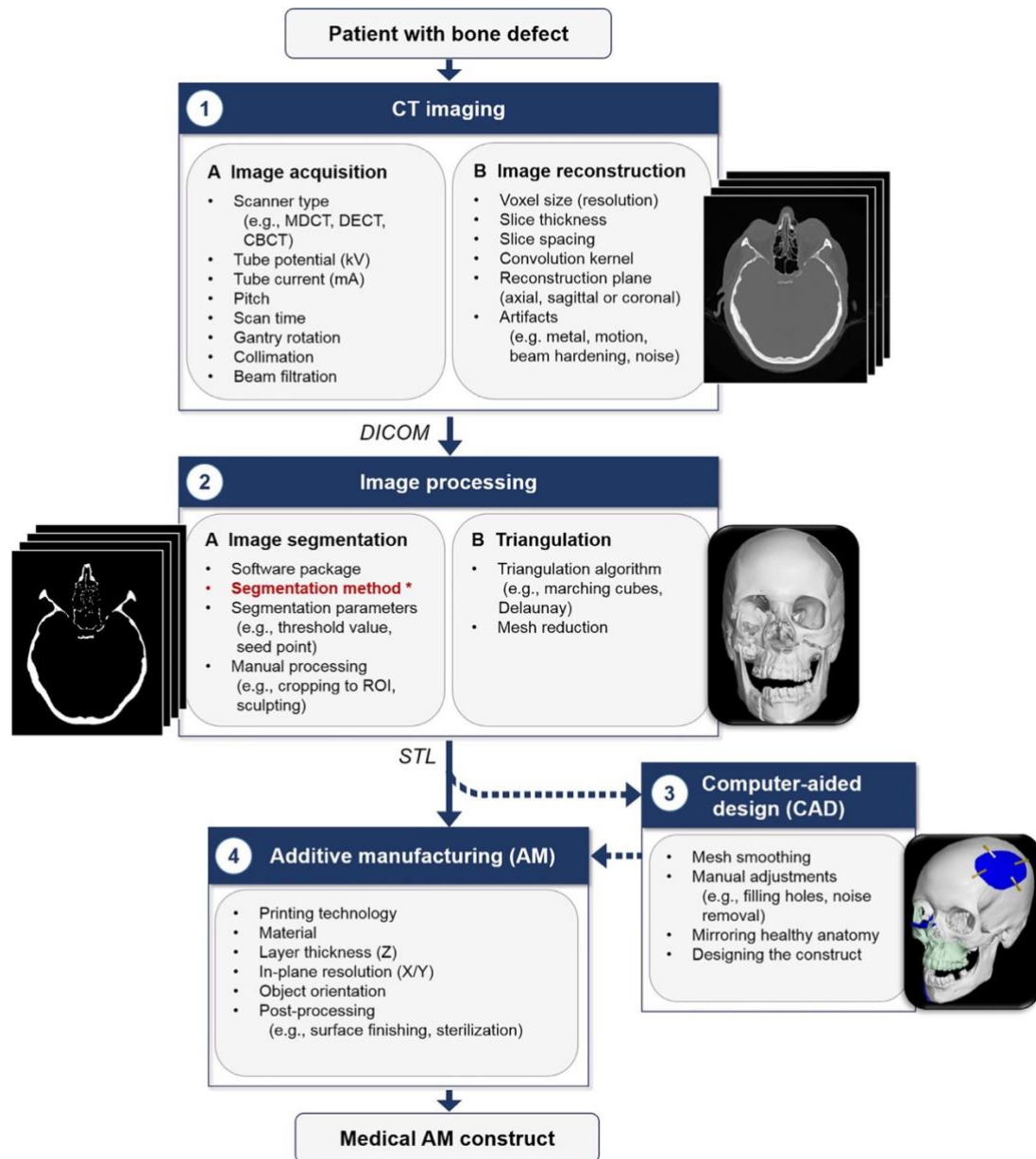


Figura 3.5: parametri che possono influenzare l'accuratezza dei prodotti ottenuti per AM [27].

I software futuri, quindi, dovranno cercare di risolvere i limiti di quelli attualmente disponibili e incorporare una maggior quantità di funzioni utili al bioprinting, come ad esempio la simulazione di ogni aspetto coinvolto nella maturazione degli scaffold (all'interno dei bioreattori) contenenti più di $10^6 - 10^9$ cellule. Attualmente una soluzione univoca non esiste, ma lo sviluppo di tali modelli matematici e computazionali permetterebbe un grande passo avanti nello sviluppo anche di questa tecnologia [25].

3.3 Tipologie di stampa

La produzione additiva rappresenta una pietra miliare nella realizzazione di geometrie complesse, a basso costo, in poco tempo e con elevata precisione. Tutto ciò richiede però una strumentazione piuttosto complessa e, come detto in precedenza, un accurato modello virtuale tridimensionale.

Ricapitolando quanto detto in precedenza: la stampante sfrutta le indicazioni fornite dal codice G-code, ottenuto da ogni slice e realizzato a partire dalla segmentazione del modello CAD, per sinterizzare, fondere o polimerizzare il materiale scelto, strato dopo strato.

Analizzando nel dettaglio le varie tecniche di stampa compatibili con l'uso medico, una prima distinzione deve essere fatta in relazione alla possibilità di stampare direttamente strutture contenenti cellule al loro interno, senza doverle inserire in un secondo momento. Si parla quindi di cell-free printing e cell-laden bioprinting, con la prima tipologia che attualmente è pienamente sviluppata e già impiegata in ambito ortopedico, mentre la seconda risulta essere ancora in fase embrionale.

A questa classificazione se ne aggiunge un'altra che si riferisce ai fenomeni fisico-chimici coinvolti nel processo di stampa, dividendo le tecnologie AM in: powder-based AM; inkjet-based AM; extrusion AM; vat photopolymerization (VP) e Light Induced Forward Transfer (LIFT).

Tuttavia, seppure molte di queste tecniche possano essere utilizzate per il cell-free printing, solo alcune sono compatibili con il cell-laden bioprinting (Figura 3.6) [22], [38].

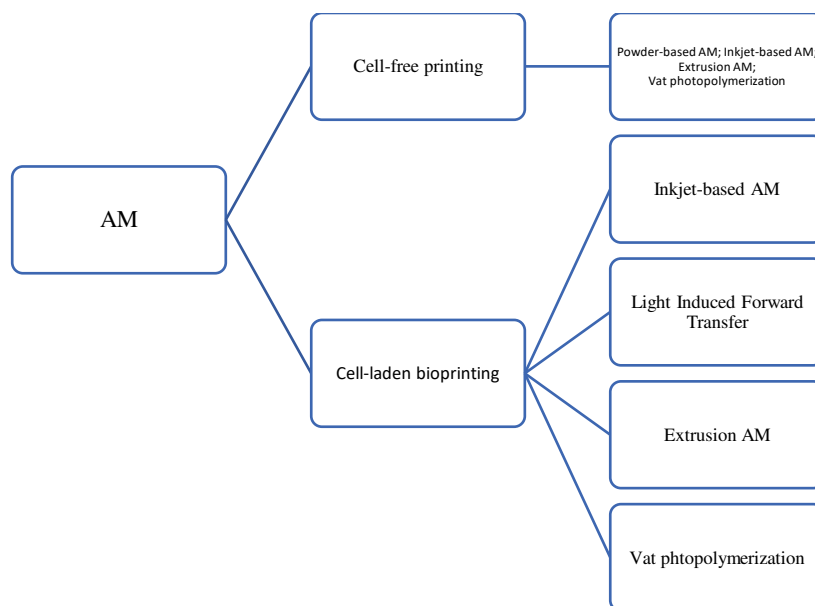


Figura 3.6: tecnologie di Additive Manufacturing disponibili per l'utilizzo in campo medico

Si introduce pertanto un ulteriore elemento, utilizzato nel cell-laden bioprinting e fondamentale per comprendere la compatibilità delle varie tecniche con la sopravvivenza e proliferazione cellulare. Il termine “bioink” racchiude l'insieme dei materiali organici e inorganici utilizzabili per il bioprinting,

che sono costituiti da una miscela di cellule e biopolimeri o biomateriali. Solo una volta che questo viene sottoposto al processo di stampa, e solidifica completamente, si parla di scaffold, ossia la struttura stampata, dotata di una precisa geometria e microstruttura, tale da favorire l'adesione e proliferazione delle cellule [39].

Va evidenziato che, affinché le cellule incorporate nello scaffold possano sopravvivere, quando il bioink viene stampato non deve essere sottoposto a temperature o pressioni troppo elevate, a raggi UV a basse lunghezze d'onda (soprattutto minori o uguali a quelle dei raggi UV-B: 280 – 315 nm), a radicali, a molecole citotossiche e cancerogene, e infine deve avere la giusta viscosità, tale da mantenere la forma dopo la stampa [38], [40].

3.3.1 Powder-based AM

Le tecnologie di stampa powder-based realizzano strutture tridimensionali utilizzando l'energia termica per fondere o sinterizzare selettivamente uno strato uniforme di materiale in polvere. Una volta che è completato il procedimento per uno strato, viene reiterato per tutti gli strati sovrastanti, fino al completamento del prodotto.

Attualmente esistono diverse varianti di queste tecniche, fra cui SLS (Selective Laser Sintering), SLM (Selective Laser Melting) ed EBM (Electron Beam Melting) si basano sull'utilizzo di un letto di materiale polverizzato; mentre la DED (Direct Energy Deposition) sfrutta la diretta deposizione di materiale (Figura 3.7).

Il principio di funzionamento di SLS e SLM si basa sull'impiego di un laser di CO₂ ad elevata energia che permette rispettivamente la sinterizzazione e la fusione delle polveri depositate (aventi diametro medio compreso fra 20 – 60 μm); mentre nel caso dell'EBM è un fascio di elettroni (di intensità >100 kW/cm²) a fondere le polveri metalliche. Per l'ultima tecnica descritta, la DED, si utilizza un laser o un fascio di elettroni per fondere un cavo metallico, così da depositare sul supporto le polveri fuse. Queste tecnologie permettono di realizzare prodotti ceramici, metallici (leghe di titanio, di cobalto-cromo, acciaio inossidabile 316L) e polimerici (policaprolattone (PCL), poliammide (PA)).

Indagando i pregi di ogni tecnica, si nota che la SLS è la più adatta a realizzare scaffold di piccole dimensioni con più elevata accuratezza; la SLM risulta migliore per qualità della superficie, densità e proprietà meccaniche; la EBM per velocità; e la DED per l'impossibilità di contaminazioni (dato che opera sottovuoto) e per le dimensioni maggiori che può produrre.

Tuttavia, l'altro lato della medaglia rivela che, a causa delle elevate temperature, nessuna di queste tecniche è effettivamente compatibile con il bioprinting, e quindi con la rigenerazione tissutale, ma solamente con la sostituzione dei tessuti mancanti o patologici, nei casi di CSD.

Inoltre, per la SLS, la mancata completa fusione delle polveri implica che la loro dimensione influisce su risoluzione, rugosità superficiale e densità del prodotto finale (in quanto permangono delle porosità che affliggono le proprietà meccaniche); la SLM richiede un'atmosfera controllata (camera inerte con gas come argon o azoto); e la DED, oltre ad avere risoluzione inferiore alle altre, richiede trattamenti di rifinitura post-stampa e necessita di operare in condizioni di vuoto [2], [22], [41].

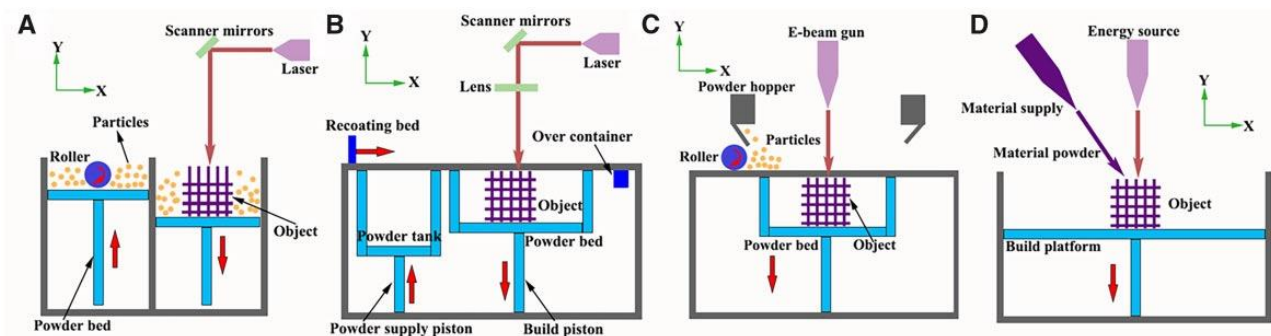


Figura 3.7: illustrazione schematica dei meccanismi di stampa powder-based. A: SLS, B: SLM, C: EBM, D: DED [22].

3.3.2 Inkjet-based AM

Le tecniche di stampa 3D inkjet based (anche dette Droplet-Based Bioprinting, DBB) sono analoghe alle comuni stampanti 2D, con la differenza che al posto di depositare un getto di inchiostro su un foglio, si depositano gocce di bioink su un substrato, attendendo che avvenga la solidificazione e poi ripetendo il procedimento per gli strati superiori. Anche in questo caso esistono due principali varianti, ossia quella a getto continuo (CJP, Continuous Jetting Printing) e quella a getto su richiesta (DOD, Drop-On-Demand); ciascuna delle quali può basare il meccanismo di fuoriuscita dell'inchiostro su fenomeni termici, piezoelettrici o su una micro-valvola (Figura 3.8). In particolare, mentre la stampante DOD risulta essere concettualmente più semplice, dato che comprende solo la generazione delle gocce di bioink, la loro deposizione e la successiva solidificazione; la CJP incorpora due meccanismi ulteriori: il primo permette il posizionamento delle gocce stesse sul substrato sfruttando campi elettromagnetici che interagiscono con la carica (o la parziale carica) dei bioink; il secondo consente il riciclo dell'inchiostro inutilizzato. Tuttavia, l'ingegnosità di questo riutilizzo è fortemente contrastata dall'elevato rischio di contaminazione a cui si può andare incontro.

La sotto-variante termica di queste stampanti coinvolge il riscaldamento di una resistenza, posta in corrispondenza della testina di stampa, in modo tale da creare velocemente e ripetutamente una bolla che espandendosi espelle la soluzione. Quella piezoelettrica si basa invece sull'applicazione di una corrente ad un cristallo piezoelettrico, in maniera che questo eserciti una pressione che permetta l'erogazione dell'inchiostro (tuttavia si noti che la sicurezza di questa tecnologia non è ancora stata studiata nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo). Infine, nel meccanismo a micro-

valvola si ha l'apertura dell'orifizio a seguito dell'innalzamento del pistone che lo chiude. Esistono ulteriori varianti, come quella ad attivazione acustica o elettrodinamica, ma meno utilizzate o non ancora testate per la stampa di cellule.

Oltre a questa panoramica specifica per il bioprinting, esiste un'ultima tipologia di stampa inkjet per il cell-free printing, detta binder jetting, caratterizzata da una cartuccia contenente una soluzione legante, una contenente il materiale sotto forma di polvere e il substrato su cui depositare entrambi. In primis si deposita la polvere del materiale e solo in un secondo momento si dispone la soluzione legante, così da unire le varie parti giacenti sullo stesso piano e i vari strati.

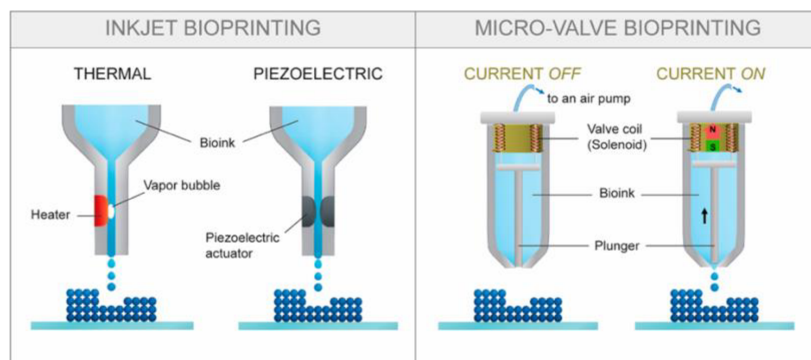


Figura 3.8: illustrazione schematica dei meccanismi di stampa inkjet [40].

Il vantaggio delle tecniche inkjet-based risiede primariamente nell'elevata risoluzione, nell'alta velocità di stampa e nel basso costo, seguito dall'alto tasso di sopravvivenza delle cellule, dalla possibilità di stampare più materiali contemporaneamente e dalla compatibilità con quasi ogni materiale e metodo di cross-linking. Tuttavia, questi benefici vengono parzialmente oscurati dagli svantaggi che tale tecnica presenta. Primo, e più importante fra tutti, l'elevata probabilità di ostruzione dell'ugello da cui fuoriesce la soluzione. Infatti, all'aumentare della viscosità, aumenta anche il rischio di questo evento, data l'elevata frequenza con cui vengono depositate le gocce (30 kHz per la tecnologia termica vs qualche kHz per quella a micro-valvola) fuoriuscite dal piccolo ugello, avente diametro pari a 10 – 150 μm per la tecnologia termica contro 100 – 300 μm per quella a micro-valvola. Questa limitazione implica anche un limite nel numero di cellule depositabili, dovendo poi porre ulteriore attenzione all'interazione con il substrato stesso. Da questo deriva infatti un altro ostacolo nella standardizzazione delle dimensioni delle gocce e della forma della linea di bioink depositata, poiché correlata a idrofobicità e rugosità del substrato, inclinazione al contatto con il substrato, tempo di viaggio, frequenza di rilascio delle gocce e temperatura (Figura 3.9).

Infine, l'ultima considerazione degna di nota riguarda la compatibilità del bioink con la temperatura raggiunta nella tecnologia termica, fattore che restringe la scelta dei biomateriali a quelli resistenti alle alte temperature (nonostante l'esposizione duri solo pochi secondi) [2], [22], [38], [40].

La tecnologia termica deve però essere indagata più approfonditamente in futuro, in quanto recenti studi asseriscono un concreto rischio derivante dall'attivazione di vie metaboliche oncogene [40].

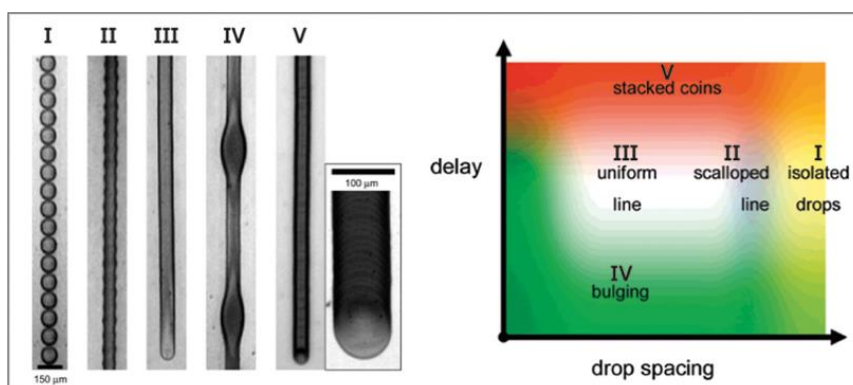


Figura 3.9: foto delle linee stampate variando frequenza di rilascio delle gocce e relativa spaziatura (a sinistra), affiancato dalla rappresentazione del comportamento della striscia al variare delle condizioni stesse (a destra). La linea uniforme III rappresenta la condizione ideale, indicata a destra dall'area bianca [40].

3.3.3 *Materials extrusion AM*

Diversamente dalle tecnologie inkjet in cui vengono espulse singole gocce di bioink dagli ugelli della stampante, nella stampa ad estrusione i biomateriali fuoriescono in maniera continua e a contatto diretto con il substrato, per mezzo di una o più testine di stampa. L'eiezione del filamento è quindi resa possibile da un dispositivo che può essere ad azione pneumatica, basato sulla pressione di un pistone, o sulla rotazione di una vite (Figura 3.10). Inoltre, si possono distinguere due sottoclassi di questa tecnica: la FDM (Fusion Deposition Modeling) e l'EBB (Extrusion-Based Bioprinting).

La differenza principale fra le due riguarda i materiali utilizzati e la loro modalità di solidificazione: infatti, nella FDM, grazie ad un ugello riscaldato, si stampano solo polimeri termoplastici fusi, che solidificano poi per raffreddamento al di sotto della temperatura di fusione caratteristica del polimero T_m ; nell'estrusione classica la deposizione dei bioink avviene a temperatura ambiente e la solidificazione dipende dalla formazione di legami fisico-chimici.

Volendo quindi escludere dalla trattazione la tecnologia FDM (nonostante la rapidità, accuratezza ed eccellenti proprietà meccaniche) per la sua evidente incompatibilità con tutti i materiali esclusi i polimeri termoplastici e con il bioprinting, si passa all'analisi della stampa per estrusione. Il fatto che l'EBB sia il metodo più diffuso in assoluto è dovuto proprio ai sostanziali vantaggi che esso comporta: innanzitutto garantisce alti livelli di sopravvivenza cellulare, accompagnati dalla facilità di controllo, da un ottimo rapporto costi-benefici, da un'intensa attività osteogenica, da elevata integrità strutturale e dalla possibilità di stampare più biomateriali contemporaneamente, senza limiti sulle viscosità e, di conseguenza, sulla densità cellulare. Oltre a ciò, essendo dotata di ugelli più grandi delle stampanti inkjet, scongiura eventuali otturazioni, e conferisce al prodotto finale ottime caratteristiche funzionali. Infine, l'ottima scalabilità e il fatto di essere l'unica tecnologia attualmente disponibile in grado di

ricreare strutture anisotrope, simili a quelle naturali, rende questa tecnica cruciale nello sviluppo del bioprinting.

D'altra parte, si pongono anche limiti notevoli quali una bassa risoluzione (e di conseguenza una ridotta riproducibilità dei prodotti), l'esposizione delle cellule ad elevati sforzi meccanici e un intervallo di viscosità limitato, determinato dalla necessità di mantenere la forma del filamento originale, di preservare le proprietà strutturali e di non sottoporre le cellule a stress eccessivi [2], [22], [38], [40], [42]. In merito a ciò, i problemi relativi alla risoluzione (sia quella nel piano, sia quella verticale) e alla fedeltà al modello CAD, rappresentano gli impedimenti principali per la realizzazione di centinaia di prodotti uguali, frenando così il processo di validazione normativa da parte di UE e FDA [40].

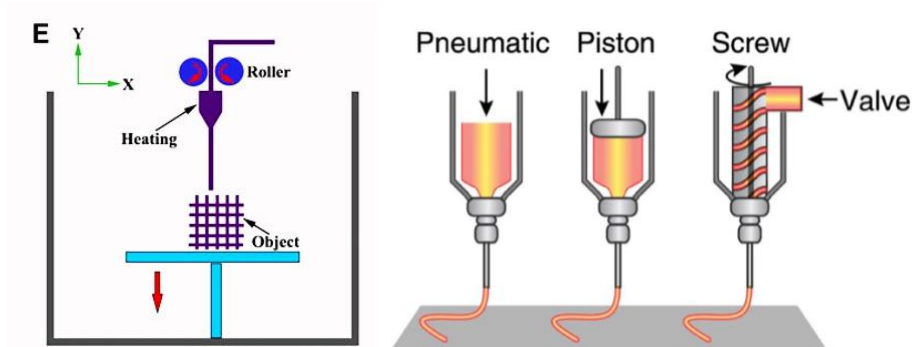


Figura 3.10: illustrazione schematica della tecnologia FDM (a sinistra) ed EBB (a destra) [22], [42].

Per migliorare questo aspetto sono state proposte due strade alternative: alterare la risposta reologica del materiale (con ovvie complessità e considerevole dispendio di tempo) oppure procedere con una modellizzazione ingegneristica del problema che permetta un'ottimizzazione del processo di stampa. Dunque, analizzando le relazioni fra larghezza del filamento depositato (variabile di interesse primario) e velocità e pressione (parametri del processo), al variare del tempo, è stato possibile migliorare la risoluzione del prodotto finale, rendendolo più simile al modello CAD. In particolare, identificando gli intervalli ottimali della velocità di stampa e della pressione di estrusione, sono stati creati un modello statico del materiale (da cui si nota una maggior sensibilità del processo alle variazioni di pressione), e un modello dinamico (che ha permesso invece di affinare la modalità di applicazione della pressione, in maniera tempo-variante).

Il controllore progettato a partire da tali considerazioni ha consentito di registrare miglioramenti apprezzabili, permettendo di ottenere uniformità nel materiale depositato e riducendo le regioni con eccessivo accumulo (soprattutto in corrispondenza dei cambi di direzione) o carenza di bioink.

Con questo approccio, la struttura finale si discosta in maniera minore dal modello CAD, presentando una migliore accuratezza e porosità, e riducendo l'errore per percentuali maggiori del 71% nella prima iterazione, e del 28% nella seconda (Figura 3.11) [43].

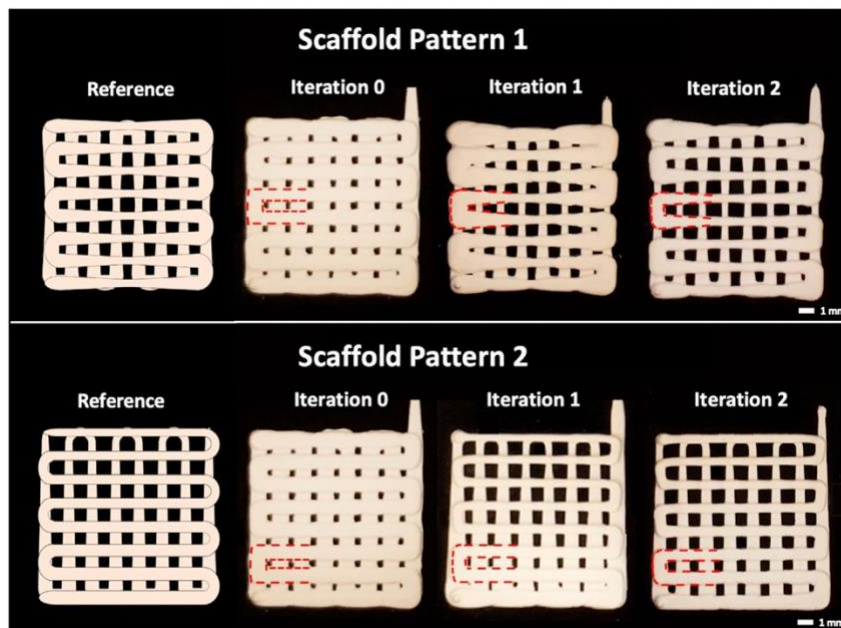


Figura 3.11: illustrazione degli scaffold ottenuti mediante ottimizzazione del processo. I pattern 1 e 2 derivano da una diversa disposizione del filamento. Partendo dal modello di riferimento (Reference), andando verso destra, si osservano rispettivamente: lo scaffold stampato a pressione costante (Iteration 0); a pressione variabile nel tempo (Iteration 1); a pressione variabile nel tempo con l'implementazione del controllo del processo (Iteration 2) [43].

3.3.4 Vat photopolymerization

La Vat Photopolymerization (VP) è una tecnologia di stampa, adatta sia per il cell-free printing, sia per il bioprinting, nella quale si inserisce la bioresina (un bioink costituito da fotopolimeri) in un catino e si irradiano specifiche regioni dello spazio per un certo intervallo di tempo (a lunghezze d'onda fissate), inducendone così l'indurimento. Creato il primo strato, si sposta la piattaforma e si realizzano quelli sovrastanti.

Questo fenomeno è alla base delle seguenti tecniche: SLA (Stereolithography), DLP (Digital Light Processing), CLIP (Continuous Liquid Interface Printing) e volumetric printing (Figura 3.12).

In realtà esisterebbe un'ulteriore tecnologia conosciuta come DLW (Direct Laser Writing) o 2P-SL (Two-Photon Stereolithography), che però, a causa della sua estrema lentezza, non si ritiene di particolare utilità nel trattamento di CSD (almeno allo stato attuale).

Procedendo con ordine, nella SLA si sfrutta un laser focalizzato per scansionare e indurre direttamente la formazione di legami fra le varie molecole di bioresina (disposte sul substrato); nella DLP la sorgente luminosa irradia indirettamente la soluzione, sfruttando uno schermo LCD o un sistema di micro-specchi DMD per polimerizzare un intero strato alla volta; nella CLIP si utilizza il medesimo sistema, ma inserendo una "zona morta" di ossigeno (o aria o azoto) fra la resina solidificata e il fondo del catino (cosicché la struttura non si attacchi e si possa spostare la piattaforma in maniera continua); infine il volumetric printing si basa sulla illuminazione di un catino di bioresina rotante, e quindi con un irraggiamento proveniente da più angolazioni.

I vantaggi offerti da queste innovazioni sono innumerevoli: per SLA, DLP e volumetric printing è già stata confermata la compatibilità con le cellule, a cui si aggiunge un'elevatissima velocità di stampa. Inoltre, la risoluzione, la libertà di forme realizzabili, la continuità fra strati diversi e l'ottima integrità strutturale costituiscono ulteriori punti di forza. Tuttavia, gli svantaggi sono costituiti dai pochi materiali compatibili (in quanto devono essere foto-indurenti e biocompatibili), la difficoltà nella stampa multi-materiale, il rischio di sedimentazione delle cellule nel catino, l'elevato costo e la necessità di trattamenti post-stampa (soprattutto in caso di stampa con più materiali diversi) [22], [40], [44].

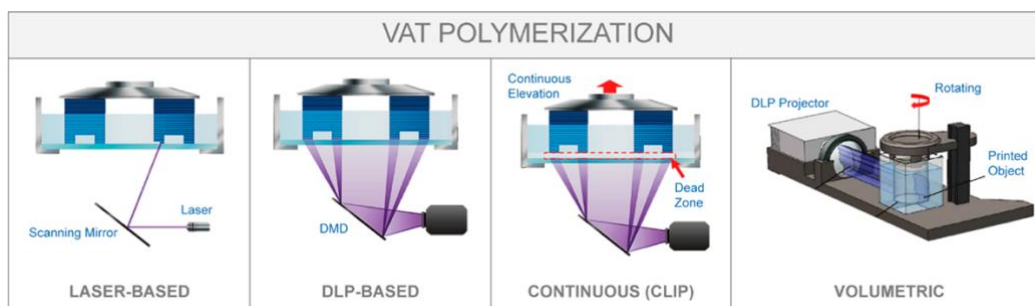


Figura 3.12: illustrazione schematica delle tecnologie SLA, DLP, CLIP, volumetric printing [40].

3.3.5 Light Induced Forward Transfer

Analogamente alle tecnologie appena discusse, anche il Light Induced Forward Transfer (LIFT) sfrutta l'energia luminosa, ma in questo caso adotta dei laser altamente focalizzati e monocromatici per irradiare un piano di vetro o metallo (detto piano assorbente), così da creare una bolla localizzata ad alta pressione nel substrato adiacente. Da quest'ultimo, detto piano donatore, provengono le gocce di bioink che si depositano sul piano ricevente sottostante, per effetto della bolla, dove si realizza lo scaffold (Figura 3.13).

Il principale vantaggio di questa tecnica, oltre all'alto tasso di sopravvivenza delle cellule e all'ottima risoluzione, riguarda la continuità nella deposizione del bioink, senza interruzione fra strati e senza alcun rischio di ostruzione degli ugelli. Inoltre, può stampare anche biomolecole come peptidi e DNA. Come ogni buona tecnologia richiede però un alto costo di produzione, è particolarmente dispendiosa in termini di tempo e ha un'elevata complessità (la regolazione dei parametri può essere ostica, aumentando il rischio di danno cellulare) [2], [28], [38], [42].

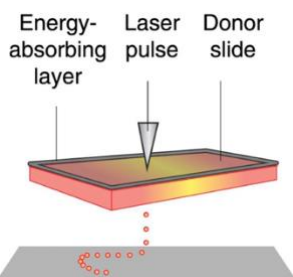


Figura 3.13: illustrazione schematica della tecnologia LIFT [42].

Per ricapitolare tutte le tecnologie analizzate, i relativi punti di forza e quelli di debolezza, si utilizzano la Tabella 3.2 per le tecniche di cell-free printing, e la Figura 3.14 e la Tabella 3.3 per riassumere quelle di cell-laden bioprinting.

	Powder-based				Inkjet-based	Extrusion-based
Parametri	SLS	SLM	EBM	DED	Binder jetting	FDM
Velocità di stampa	Lenta	Lenta	Veloce	Veloce	Media (6 – 14 mm/s)	Lenta (0.2 – 10 mm/s)
Dimensione particella (µm)	50 – 150	20 – 60	45 – 105	25 – 75	< 1– 150	-
Risoluzione verticale (µm)	20 – 100	20 – 100	50	250	15 – 300	100 – 200
Materiali compatibili	Metallici, ceramici, polimerici	Metallici	Metallici	Metallici	Metallici	Polimerici (termoplastici); compositi (metalli/polimeri)

Tabella 3.2: descrizione riassuntiva comparativa delle varie tecnologie di cell-free printing [22].

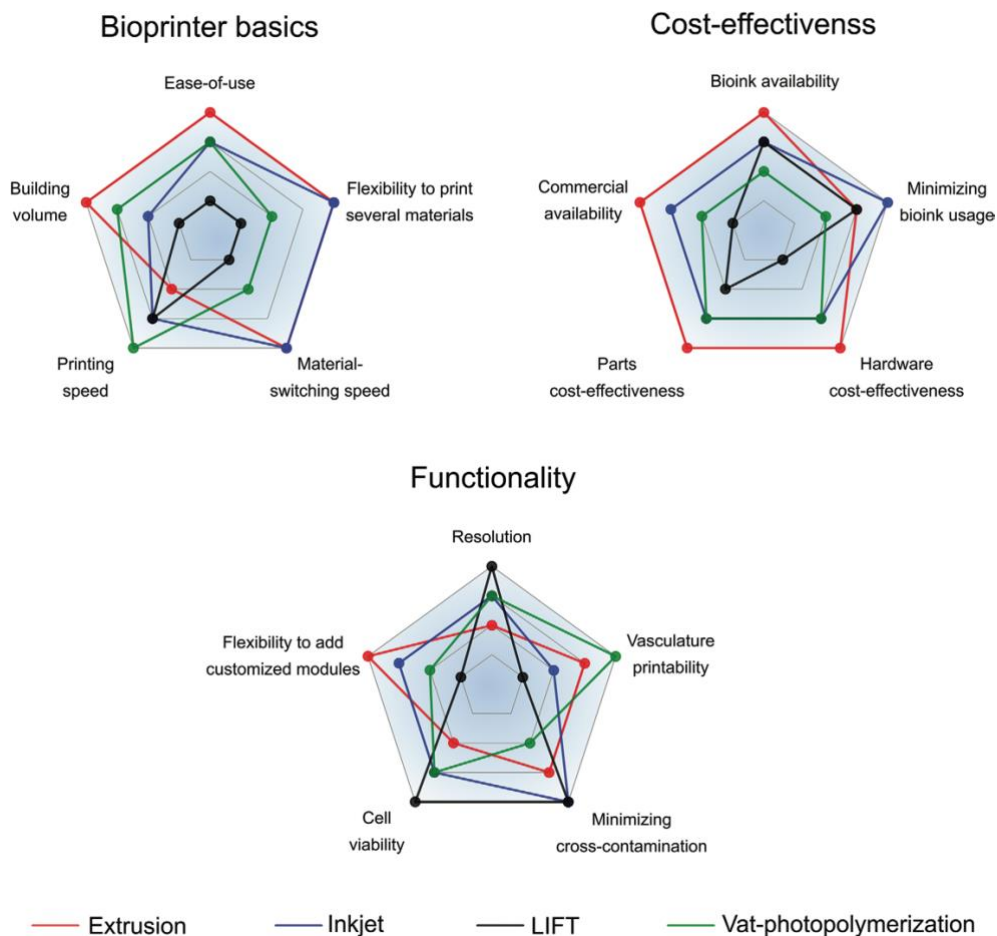


Figura 3.14: confronto grafico fra le caratteristiche delle varie tecnologie disponibili per il cell-laden bioprinting [45]

	Droplet-based (DBB)			Extrusion-based (EBB)	Vat Photopolymerization (VP)				LIFT
Tipologia	Termica	Piezoelettrica	Micro-valvola	EBB	SLA	DLP	CLIP	Volumetric printing	LIFT
Velocità di stampa	Veloce (1 – 10 ⁴ gocce/s) ^{a, b, g} 10 ⁵ gocce/s ^h 30 kHz ^d	Veloce (1 – 10 ⁴ gocce/s) ^{a, b, g} 10 ⁵ gocce/s ^h 30 kHz ^d	Qualche kHz ^d	Lenta ^{c, g} 10 – 700 mm/s ^h	Veloce ^{a, f, g}	Veloce ^a Molto veloce ^d	Molto veloce (25 – 100 mm/h) ^d	Estrema (decine di secondi) ⁱ	Medio ^{c, g} – Veloce ^{b, c} 200 – 1600 mm/s ^h
Sopravvivenza cellulare	> 85 % ^{a, b, g, h}	NT ^d	> 85 % ^{a, b, g, h}	80 – 90 % ^{a, h} 40 – 80 % ^{b, g}	> 90 % ^a , > 85 % ^g	> SLA ^a	NT ^d		> 95% ^{b, g, h}
Densità cellulare (cellule/mL)	< 10 ⁶ ^{a, d, g}	NT ^d	< 10 ⁶ ^{a, d, g}	> 10 ⁸ ^{a, g, h}	< 10 ⁸ ^{a, g}	< 10 ⁸ ^a	NT ^d		Alta ^c < 10 ⁸ ^{g, h}
Intervallo di viscosità	Stretto (3.5 – 12 mPa/s) ^{a, b, g} < 10 mPa/s ^h < 15 mPa/s ^d	Stretto (3.5 – 12 mPa/s) ^{a, b, g} < 10 mPa/s ^h < 15 mPa/s ^d	Stretto (3.5 – 12 mPa/s) ^{b, g} < 10 mPa/s ^h < 200 mPa/s ^d	Esteso (30 – 6·10 ⁷ mPa/s) ^{a, b, g, h}	- ^{a, g}	- ^{a, g} 10 – 5 000 mPa/s ^d	10 – 5 000 mPa/s ^d	< 90 000 mPa/s ^d	Stretto - moderato (1 – 300 mPa/s) ^{b, g, h}
Risoluzione	75 μm ^a Alta ^{c, g} 10 – 50 μm ^h 50 – 500 μm ^d	75 μm ^a Alta ^{c, g} 10 – 50 μm ^h 50 – 500 μm ^d	75 μm ^a Alta ^{c, g} 10 – 50 μm ^h 50 – 500 μm ^d	200 – 1000 μm ^{a, h} Buona ^{b, g} Bassa ^c 100 – 600 μm ^d	60 – 150 μm ^a Molto alta ^{c, e, f, k} > 5 μm ⁱ	25 – 50 μm ^a > 5 μm ⁱ 25 – 150 μm ^d	25 – 150 μm ^d	> 100 μm ⁱ 25 – 150 μm ^d	Alta ^{c, g} 10 – 100 μm ^h
Risoluzione verticale	Bassa ^g	Bassa ^g	Bassa ^g	Alta ^g	50 – 150 μm ^f Buona ^g	25 – 100 μm ^d	Decine di μm ^d		Buona ^g
Proprietà meccaniche	Basse ^{e, d} Moderate ^k	Basse ^{e, d} Moderate ^k	Basse ^{e, d} Moderate ^k	Basse ^c	Basse ^{c, f} Moderate ^k	Ottima ^d	Ottima ^d	Ottima ^d	
Materiali	Polimerici ^a (termoplastici)	Polimerici ^a (termoplastici)	Polimerici ^a (termoplastici)	Polimeri ^a	Bioresine ⁱ (fotopolimeri)	Bioresine ^{d, i} (fotopolimeri)	Bioresine ^d (fotopolimeri)	Bioresine ^{d, i} (fotopolimeri)	
Stampa multimateriale	Sì ^{c, k} Facile ^d	Sì ^{c, k} Facile ^d	Sì ^{c, k} Facile ^d	Sì ⁱ Media difficoltà ^d	Difficile ⁱ	Difficile ^{i, d}	Difficile ^{i, d}	Difficile ^{i, d}	
Dimensioni scaffold	cm ^d	cm ^d	cm ^d	cm ^d	Estese ^k	cm ^d	cm ^d	cm ^d	Limitate ^c
Resa	Molto alta ^d	Molto alta ^d	Molto alta ^d	Media ^d		Media ^d	Media ^d	Media ^d	

Costo	Basso ^{b, c, g, h} 5000 \$ ^d	> Termica ^d Basso ^{g, h}	5000 \$ ^d	Medio ^{g, h} 30 k – 250 k \$ ^d	Basso ^g Medio ^{f, k} 3.5 k – 5 k \$ ^l	30 k – 50 k \$ ^d	30 k – 50 k \$ ^d	30 k – 50 k \$ ^d	Alto ^{b, g, h}
Rischi e lati negativi principali	Ostruzione ugello; danno cellulare a 15 – 25 kHz ^b ; limitata dimensione pori e dissoluzione se usati solventi organici ^c ; tecnologia termica forse oncogena ^d			Stress meccanico o termico a livello cellulare ^{c, h}	Necessità di trattamenti post-stampa (lunghi) ^e	Rischio di danni cellulari dovuti a raggi UV o foto-iniziatori ^d		Rischio di danni cellulari dovuti a raggi UV o foto-iniziatori ^d ; alte densità cellulari richiedono modifiche software ⁱ	Lunga preparazione del substrato ^b ; complesso controllo del laser ^h

Tabella 3.3: tabella riassuntiva dei parametri associati alle rispettive tecnologie di bioprinting. NT indica Non Testato; il trattino (-) indica nessun limite; i campi vuoti dipendono dall'assenza di dati nella letteratura scientifica esaminata. Ogni lettera usata come apice è associata ad una rispettiva fonte. Non si usa la lettera j per evitare confusioni con la lettera i. Le fonti utilizzate sono le seguenti: (a) [22], (b) [12], (c) [46], (d) [40], (e) [32], (f) [34], (h) [39], (i) [47], (k) [29], (l) [21].

Capitolo 4: Stampa 3D: produzione di sostituti ossei e scaffold

Lo sviluppo delle tecniche di stampa 3D, dei software di progettazione e di quelli relativi al controllo del processo è certamente fondamentale per ottenere dei prodotti adeguati all'uso medico, ma lo sono altrettanto le innovazioni nei materiali impiegati. A seconda del tipo di materiale utilizzato nella costruzione dell'impianto si può fare fin da subito una distinzione fra la medicina sostitutiva e quella rigenerativa. Infatti, pur essendo entrambe incluse all'interno del settore della medicina di precisione (in quanto, nei casi di CSD, il sostituto osseo viene realizzato su misura per il paziente), l'approccio rigenerativo permette di giungere alla guarigione del soggetto attraverso l'integrazione e il totale riassorbimento dell'impianto; dall'altra parte, nell'approccio sostitutivo si ha un'integrazione solo parziale del supporto, senza una sua degradazione completa.

Attualmente, l'unica modalità testata con efficacia su esseri umani risulta essere quella sostitutiva, mentre quella rigenerativa è ancora relegata allo stadio di ricerca, con test in vitro e, eventualmente, su modello animale.

Prima di introdurre i contenuti salienti, si ricordano i requisiti ideali degli scaffold che si vogliono creare (descritti nel paragrafo 3.1) e gli ostacoli che ne impediscono la realizzazione. Infatti, essendo il tessuto osseo una struttura eterogenea, dinamica, altamente organizzata e vascolarizzata, è necessario che il sostituto abbia le medesime proprietà, impossibili però da ricreare con le metodologie tradizionali. In questo senso le tecniche di AM rappresentano un notevole balzo in avanti, seppur, ora come ora, anch'esse presentino dei limiti considerevoli, quali:

- la difficoltà di stampare più materiali e più tipologie di cellule contemporaneamente (così da dotare il tessuto osseo di una componente vascolare e nervosa);
- la difficoltà di ricreare strutture anisotrope stabili con proprietà fisico-chimiche variabili a seconda delle necessità (anche all'interno dello scaffold stesso), compatibili con quelle fisiologiche, e adatte all'impianto nell'organismo;
- la difficoltà di realizzare scaffold multifunzionali capaci di coniugare bioattività, buone proprietà meccaniche e antimicrobiche e una cinetica di degradazione simile a quella di crescita del tessuto osseo;
- l'impossibilità di ricreare rapidamente strutture con cavità interne interconnesse, simili a quelle vascolari (tali da permettere perfusione e interconnessione delle cellule stampate fin dai primi istanti);
- l'impossibilità di creare tessuti di dimensioni adatte all'impiego nei CSD (nell'ordine dei centimetri) in grado di sopravvivere nel medio-lungo periodo;
- la difficoltà nell'identificare la composizione ottimale dei materiali per soddisfare le precedenti richieste e quelle imposte dalle tecnologie di stampa [23], [42], [48].

Con la consapevolezza dell'esistenza di questi impedimenti tecnologici, si illustrano in questo capitolo le varie tipologie di materiali clinicamente impiegate e quelle attualmente in fase di ricerca e sviluppo, distinguendo fra materiali metallici, ceramici e polimerici, con accenni anche ai compositi. In genere questi ultimi garantiscono migliori proprietà dei materiali costituenti presi singolarmente, mitigandone gli svantaggi e permettendo di realizzare anche scaffold multifunzionali.

4.1 Materiali metallici

L'impiego dei materiali metallici nella realizzazione di scaffold stampati in 3D richiede l'ausilio di tecniche di cell-free printing, in cui il materiale di partenza (sotto forma di un filo o polvere metallica) viene sottoposto a fusione o sinterizzazione. Proprio a causa delle elevate temperature raggiunte durante questo processo, tali materiali non sono compatibili con il cell-laden bioprinting (a meno che non siano inseriti come additivi) e quindi le cellule possono essere incorporate nello scaffold solo mediante trattamenti post-printing.

Allo stato attuale, il motivo per cui vengono prediletti nel trattamento dei CSD è relativo alle proprietà che essi conferiscono al prodotto finale. In generale, garantiscono ottime proprietà meccaniche e resistenza alla corrosione e alla fatica, buona biocompatibilità, buona resistenza all'usura e infine potenzialità di ricrescita del tessuto osseo sulla loro superficie. Inoltre, essendo duttili, non vanno incontro a rottura fragile e in alcuni casi i loro prodotti di degradazione (ioni Mg^{2+}), oltre ad essere biocompatibili, sono anche bioattivi.

Per questa serie di motivi, spesso sono indicati come ideali per la costruzione di scaffold volti alla sostituzione di segmenti ossei in siti anatomici in cui è richiesta elevata capacità di sopportazione di carichi esterni oppure che si rivelano particolarmente esposti a fenomeni di corrosione.

Fra i loro punti deboli figurano però la difficoltà di degradazione del supporto stesso, che non corrispondendo alla velocità di ricrescita del tessuto osseo, ne impedisce l'integrazione completa; la possibile tossicità che la loro eccessiva corrosione può causare (Tabella 4.1) e il rischio di stress shielding. Soprattutto questi ultimi due fattori sono critici per la buona riuscita dell'impianto e possono perciò compromettere seriamente la stabilità della struttura e la salute del paziente [2], [5], [22], [28].

METALLO	EFFETTO
ALLUMINIO	Epilessia e Alzheimer
VANADIO	Tossicità generica
CROMO	Ulcere e disturbi relativi al sistema nervoso centrale
COBALTO	Anemia
NICKEL	Dermatiti

Tabella 4.1: effetti tossici di alcuni metalli a seguito di corrosione [5].

4.1.1 Tipologie di metalli

4.1.1.1 Tantalio

Il tantalio (Ta) è un metallo di transizione caratterizzato da elevatissimo punto di fusione (3290 K), elevata densità (16.4 g/cm³), alta affinità con l'ossigeno e scarse proprietà meccaniche. Nelle applicazioni in vivo dimostra buone capacità anticorrosive, grazie all'ossidazione dello strato più superficiale, che consente di proteggere la struttura sottostante. Tuttavia, dal momento che in ambito medico si prediligono materiali leggeri, resistenti e facilmente lavorabili, il suo impiego rimane particolarmente limitato, e spazia dalla realizzazione di fili di sutura, alla creazione di strutture trabecolari osteoinduttive, osteoconduttive e dotate di porosità interconnesse.

Questa lavorazione, sfruttata soprattutto nella produzione di protesi d'anca, è quella di maggiore interesse clinico. Infatti, seppur di solito il tantalio trabecolare sia il frutto di un particolare processo di deposizione termica (e quindi sia solamente applicato come coating superficiale), in altri casi può anche derivare da tecnologie di stampa 3D, che garantiscono migliori performance e lavorabilità. In particolare, sfruttando le tecnologie SLM ed EBM sono stati realizzati degli scaffold in tantalio poroso caratterizzati da una buona osteointegrazione e porosità pari al 75% (sul volume totale), con pori di dimensioni comprese fra 400 – 600 μm [5], [22], [49]. Tuttavia, l'impiego di supporti in tantalio poroso comporta un rischio nelle modalità di trasferimento del carico fisiologico, derivante dalla differenza fra il modulo di Young del metallo (Ta poroso: 3 GPa) e quello dell'osso trabecolare [50].

4.1.1.2 Titanio

Il titanio (Ti) è un metallo di transizione caratterizzato da eccellenti proprietà meccaniche, temperatura di fusione elevata (1941 K), bassa densità (4.5 g/cm³), buona biocompatibilità e buona resistenza a corrosione (grazie alla formazione di un sottile film di TiO₂). Nonostante ciò, è necessario porre particolare attenzione ai materiali con cui il titanio entrerà in contatto una volta impiantato (dato che tende a grippare quando accostato a sé stesso o ad altri metalli), e all'ambiente in cui viene prodotto, in quanto impurezze di alcuni elementi (ossigeno primo fra tutti) hanno un effetto deleterio sulla sua duttilità e resistenza. In aggiunta, un altro fattore che può determinare il fallimento dell'impianto è il fenomeno di stress shielding.

Per ottenere un materiale più stabile, anche se meno biocompatibile, il titanio puro (CP-Ti) può essere combinato ad altri elementi, come alluminio (Al) e vanadio (V), al fine di creare una lega metallica con proprietà meccaniche migliori (Ti6Al4V). Nello specifico, l'inserimento di un contenuto pari al 6% di alluminio e al 4% di vanadio permette di stabilizzare il titanio rispettivamente nella sua forma allotropica α (a temperatura minore di 882°C) e nella forma β (a temperatura maggiore di 882°C).

Oltre a questo beneficio, la lega Ti6Al4V, se sottoposta a trattamenti termici, può incrementare la sua resistenza meccanica fino al 50%, pur mantenendo inalterato il valore del modulo elastico. A tal proposito, l'enorme differenza esistente fra il modulo di Young del tessuto osseo e quello del titanio (CP-Ti: 103 – 107 GPa; Ti6Al4V: 114 – 120 GPa) è la causa del già citato fenomeno di stress shielding, evitabile però mediante un'accurata progettazione dell'impianto.

La tecnologia della stampa 3D per la realizzazione di sostituti ossei a base di titanio è già stata testata a livello clinico. Uno studio su 21 pazienti si è focalizzato sull'analisi dei difetti della calotta cranica, attestando la buona riuscita degli interventi sostitutivi in 20 soggetti, con un solo caso di complicazioni [2], [5], [22], [49].

Attualmente, alcune aziende hanno già allestito divisioni specializzate nella progettazione di impianti ossei personalizzati, specifici per soggetti affetti da CSD, derivanti da traumi o interventi di revisione protesica. Affinché si possa giungere alla completa guarigione da questo stato patologico, o comunque ottenere un buon recupero post-operatorio, si può sfruttare una tecnologia che da oltre un decennio si dimostra estremamente valida nel fissaggio delle protesi d'anca e, più recentemente, anche nella produzione di impianti custom-made per il trattamento di CSD: il Titanio Trabecolare (Trabecular Titanium®, TT). Il Titanio Trabecolare è un biomateriale biocompatibile, realizzato e con design brevettato da Lima Corporate S.p.A. (San Daniele del Friuli, Udine), e caratterizzato da una struttura tridimensionale regolare, derivante dalla ripetizione di celle esagonali cave e interconnesse. La porosità intrinseca di questa architettura (pari a circa il 65 % del volume totale, con pori di dimensione media 640 µm) non altera significativamente le proprietà meccaniche del materiale e contribuisce ad incrementare il suo potenziale osteoconduttivo e osteogenico, con ovvi benefici relativi all'osteointegrazione dell'impianto. Inoltre, il suo inserimento all'interno del corpo umano non desta particolari preoccupazioni, in quanto, grazie al modulo elastico relativamente basso (TT: 1.12 GPa), evita l'occorrenza dei fenomeni di stress shielding; inoltre, la procedura di fissaggio risulta agevolata, dal momento che possiede un elevatissimo coefficiente di attrito, soprattutto se paragonato a strutture analoghe ottenute per deposizione di coating (TT: 2.2; Plasma Sprayed Titanium: 0.6). Quest'ultima caratteristica impedisce ogni tipo di micro- o macro-spostamento e favorisce la stabilità meccanica dell'impianto in vivo (stabilità primaria).

La vera peculiarità di questa tecnologia risiede però nella modalità con cui viene creata: essendo il frutto di un processo di stampa 3D (via EBM), viene creata una struttura rugosa, coesa e continua che non è caratterizzata dalla presenza di discontinuità al suo interno e quindi manifesta una resistenza molto maggiore rispetto a quella ottenibile mediante deposizione di coating. Da ciò deriva quindi maggiore solidità e una riduzione del rischio di fenomeni galvanici e di delaminazione.

Tutte queste caratteristiche favoriscono l'osteointegrazione degli impianti già dalle prime settimane (soprattutto se comparati alle tecnologie ottenute mediante coating), fornendo dapprima un'ottima stabilità primaria e agevolando poi il processo di stabilizzazione secondaria [50].

Nella Figura 4.1 si presenta l'esempio di un dispositivo realizzato in Titanio Trabecolare per la sostituzione ossea, nel trattamento di CSD, e la geometria della relativa microstruttura.

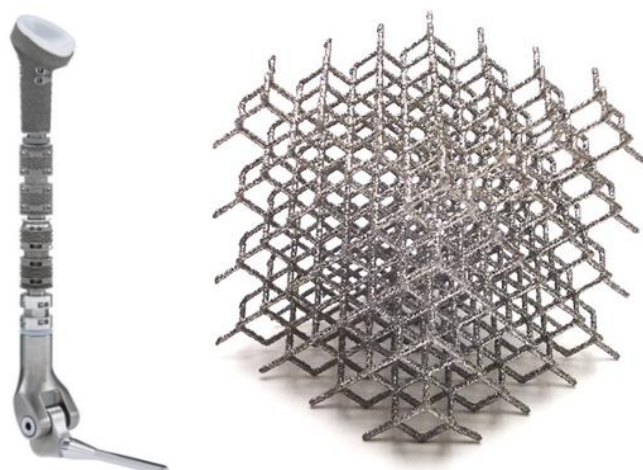


Figura 4.1: fotografia di un sostituto osseo in Titanio Trabecolare per il trattamento di CSD (a sinistra) affiancato dalla rappresentazione della microstruttura del Titanio Trabecolare (a destra) [51].

4.1.1.3 Magnesio

Il magnesio (Mg) è un metallo alcalino terroso con basso punto di fusione (923 K) e bassa densità (1.74 g/cm^3), buona biocompatibilità e biodegradabilità, ma alta reattività a contatto con l'ossigeno. Essendo un metallo biodegradabile, i cui prodotti di degradazione sono cationi (ioni Mg^{2+}), con il passare del tempo favorisce la creazione di un ambiente alcalino all'interfaccia, stimolando la rigenerazione del tessuto osseo.

Per tutti questi motivi, è di grande interesse nell'ambito ortopedico, ma la sua difficoltà di produzione, causata dall'alta reattività e dal conseguente rischio di combustione accidentale, lo confina alla sola costruzione di viti di fissaggio per impianti ossei, sotto forma di metallo puro o leghe, come MgYReZr (sotto il nome commerciale di MAGNEZIX[®]) e MgCaZn.

Nonostante queste problematiche, il magnesio continua a catalizzare l'attenzione nell'ambito della ricerca relativa alla stampa 3D (in particolare SLM, DED e binder jetting), soprattutto come additivo in scaffold compositi. La complicazione principale riguarda la determinazione della composizione adeguata a conferire buone proprietà meccaniche e a far combaciare la cinetica di degradazione del supporto con quella della ricrescita del tessuto osseo.

Infine, data l'elevata reattività a contatto con l'atmosfera, l'ambiente in cui avviene il processo di stampa deve essere accuratamente controllato (atmosfera inerte) [22], [49].

4.1.1.4 Leghe di cobalto-cromo

Le leghe di cobalto-cromo (Co-Cr) sono leghe metalliche connotate da un'eccellente resistenza alla corrosione e all'usura, alta tensione di snervamento e limitato danno a fatica. Per questi motivi sono spesso impiegate nella produzione di impianti da posizionare in zone soggette al sostegno di carichi fisiologici e/o esterni.

Analizzando le proprietà fisico-chimiche dei singoli elementi primari costituenti la lega (cobalto e cromo), si nota come siano simili fra loro, con alte temperature di fusione (rispettivamente pari a 1768 K e 2180 K), e densità ben più alte di quella del titanio (uguale a 8.86 g/cm³ e 7.15 g/cm³). Nel dettaglio, si tratta di due metalli di transizione, con il cobalto che costituisce circa il 60% della lega metallica finale e determina l'alta tensione di snervamento e il limitato danno a fatica; e il cromo che invece accresce la resistenza meccanica, la resistenza all'usura e la resistenza alla corrosione (grazie alla formazione di un sottile strato superficiale di Cr₂O₃).

Dal punto di vista della produzione additiva, la ricerca nel settore odontoiatrico ha già dato i suoi primi frutti, con la realizzazione di prodotti, mediante SLM, dotati di maggiore resistenza meccanica, rispetto a quelli ottenuti con i metodi tradizionali di colata. Il vantaggio si estende anche all'ortopedia, con la possibilità di creare strutture porose a celle aperte interconnesse tramite la tecnologia EBM, in lega Co-Cr-Mo (più precisamente Co-29Cr-6Mo). Queste hanno dimostrato un'ottima compatibilità nelle applicazioni femorali, con un modulo di Young paragonabile a quello osseo locale.

Gli unici svantaggi di questa tipologia di materiali riguardano il peso maggiore rispetto al titanio e il rischio di assistere ad una diminuzione della duttilità con l'aumento della resistenza [5], [22], [49].

4.1.2 Trattamenti post-printing per i materiali metallici

Nonostante le ottime proprietà di questi materiali metallici, è attiva una costante ricerca finalizzata allo sviluppo di trattamenti post-stampa per migliorarne ulteriormente le loro caratteristiche.

Esistono diverse tecniche possibili, che spaziano dalle modifiche chimico-fisiche, alla deposizione di coating ceramici o polimerici sul prodotto finale. Chiaramente sono disponibili molte altre modalità, ma la loro analisi dettagliata esula dagli scopi di questo elaborato e, pertanto, ci si limita ad indicare i vantaggi che apportano.

Alla prima categoria appartengono sia i trattamenti più basilari, come ad esempio quelli di tipo termico, la sabbiatura e il trattamento con acidi; sia quelli più complessi da un punto di vista della strumentazione richiesta, come nel caso della deposizione fisica da vapore (Physical Vapor Deposition, PVD). Dunque, le modificazioni di tipo chimico-fisico consentono di ottenere maggiore resistenza meccanica, all'usura e alla corrosione; nonché benefici relativi alla rugosità, all'idrofilicità e quindi, indirettamente, alla biocompatibilità e all'osteointegrazione dello scaffold stesso.

La deposizione di coating superficiali può fornire invece migliori proprietà meccaniche e bioattive, incrementando così il potenziale osteogenico e antimicrobico. I coating, infatti, se opportunamente progettati, consentono la possibilità di includere siti attivi utili al rilascio controllato di farmaci o di molecole con proprietà antimicrobiche. Tuttavia, lo sviluppo della maggior parte di queste tecnologie è ancora acerbo e quindi non ancora disponibile in commercio [22].

Per ulteriori approfondimenti in merito alla tematica dei trattamenti post-printing, con l'analisi dettagliata delle varie tecnologie esistenti, si rimanda alla fonte appena citata.

4.2 Materiali ceramici

Per via delle loro proprietà, i materiali ceramici hanno trovato largo impiego nel settore ortopedico, ma la loro produzione non è così semplice e richiede particolare prudenza. Infatti, questi materiali, caratterizzati da un'altissima temperatura di fusione, non possono essere lavorati con le stesse tecniche dei metalli, né tantomeno possono essere realizzati sfruttando il cell-laden bioprinting (a meno che non vengano usati come additivi dei bioink).

Il processo di realizzazione degli scaffold ceramici, mediante stampa 3D, si fonda sull'indurimento di bioresine (tecnologie extrusion-based o VP); oppure, più comunemente, sulla coalescenza delle polveri del materiale, indotta da un laser di CO₂ (tecnica powder-based SLS).

Questi processi consentono la generazione di strutture biocompatibili, biomimetiche e porose, con la possibilità di controllare accuratamente distribuzione, geometria, dimensione e interconnessione dei pori. La corretta regolazione di tutti questi parametri consente di aumentare notevolmente il potere bioattivo dello scaffold, con miglioramenti a cascata relativi agli aspetti di osteoconduttività e osteoinduttività, pur mantenendo un basso costo di produzione. Peraltro, l'ausilio delle tecniche di stampa 3D, agevola notevolmente la produzione di massa, rendendola facilmente riproducibile e permettendo di ottenere maggiore stabilità nelle proprietà fisico-chimiche. Sotto tale aspetto i ceramici sfoggiano proprio le loro migliori caratteristiche: bassa densità, elevata durezza, buone proprietà tribologiche, e possibilità di degradazione in vivo. Ciò permette dunque la generazione di un ambiente extracellulare favorevole alla crescita ossea, con abbondanza di cationi e sufficiente spazio per la proliferazione e l'interazione fra le cellule. Quest'ultimo fattore si ricollega indirettamente anche alle proprietà meccaniche, in quanto la creazione di canali haversiani "artificiali" favorisce sia l'attività biologica del tessuto in via di formazione e la relativa perfusione, sia la dissipazione degli stress meccanici, prevenendo quindi eventuali fenomeni di frattura.

Tuttavia, le difficoltà nel creare una simile architettura, nell'indurre il processo di angiogenesi e, soprattutto, le scarse proprietà meccaniche dei prodotti ottenuti, rendono impossibile l'impianto di

scaffold ceramici puri all'interno del corpo e, pertanto, spesso vengono usati solo come coating superficiale o comunque combinati ad altre tipologie di materiali, originando così scaffold compositi. A tal proposito, esattamente come è possibile migliorare le proprietà meccaniche dei ceramici puri mediante trattamenti post-printing, si possono ottimizzare pure i materiali compositi. Nello specifico, quelli derivanti dall'indurimento di bioresine (ceramici/polimerici) possono essere sottoposti a trattamenti termici che permettono di far volatilizzare la componente carboniosa sotto forma di CO₂ gassosa. La rimozione di questa impurezza, dovuta alla presenza dei monomeri nella bioresina, permette di ottenere un materiale ceramico ad elevata purezza, sensibilmente rafforzato e indurito [5], [22], [32], [48].

4.2.1 Tipologie di ceramici

4.2.1.1 Vetri biologici

I vetri biologici sono una classe di composti ceramici con ottime proprietà osteogeniche e biomimetiche, ma penalizzati da una lenta degradazione e dalla fragilità eccessiva. Proprio per quest'ultima ragione, sono estremamente sconsigliati per la costruzione di scaffold puramente ceramici, specie se destinati all'inserimento in zone soggette a carichi elevati. Spesso quindi sono utilizzati come semplici additivi nella realizzazione di materiali compositi, in cui apportano un sostanziale miglioramento alla bioattività. Fra i vetri biologici, eccelle per qualità il Bioglass® (BG), di cui Corning Inc. detiene la proprietà intellettuale.

Nel tempo, lo sviluppo dei vetri biologici ha condotto alla creazione del cosiddetto biovetro mesoporoso (Mesoporous Bioglass, MBG), contraddistinto da un'elevata superficie specifica (superficie totale di un materiale per unità di massa o di volume) e un ampio volume dei pori. La simbiosi di questi due fattori facilita ulteriormente l'adesione cellulare, con conseguenti benefici anche sull'attività di formazione del tessuto osseo.

La letteratura scientifica riporta svariati casi di applicazione di questi materiali, sia in vitro, sia in vivo. In particolare, quelli in vivo sfruttano solamente piccole particelle di BG inserite all'interno di materiali compositi ben più grandi, mentre quelli in vitro si concentrano anche sulla realizzazione di scaffold con materiali ceramici puri, eventualmente dopati con polimeri e/o atomi metallici. Nello specifico, alcuni scaffold in Cu-MBG (ossia MBG dopato con particelle di rame) hanno dimostrato una buona espressione osteogenica e angiogenica [2], [5], [22], [28], [32].

4.2.1.2 Silicati di calcio

I silicati di calcio (CSi), sono composti ceramici che si contraddistinguono in maniera positiva prevalentemente per la loro bioattività. Infatti, la loro degradazione provoca il rilascio di cationi Si²⁺

che stimolano la produzione di collagene di tipo I e altre biomolecole essenziali per il processo di neomorfogenesi ossea. Questo pregio si rivela però un'arma a doppio taglio, in quanto, essendo la cinetica di degradazione di questi materiali particolarmente veloce, esiste il rischio di provocare la formazione di un ambiente eccessivamente alcalino, pericoloso per la sopravvivenza cellulare.

Per ovviare a questo problema, si sono studiati scaffold appositi che integrano ioni Mg^{2+} , con risultati soddisfacenti nel controllo del rateo di degradazione e nella stabilità fisico-chimica. L'innovazione di maggiore importanza in tal senso è stata rilevata dall'analisi di una struttura porosa a nido d'ape, realizzata in CSi-BG. Questa infatti ha dimostrato che le porosità di forma esagonale esibiscono spiccata resistenza meccanica, anisotropia e maggiore superficie specifica, con ovvi benefici relativi alla stabilità strutturale e ai fenomeni di adesione e proliferazione cellulare [22].

4.2.1.3 Fosfati di calcio

I fosfati di calcio (CaPs) sono la classe di ceramici più importante nel settore ortopedico e si possono dividere in due sottocategorie: le idrossiapatiti e il fosfato tricalcico.

Le idrossiapatiti (HA) prodotte artificialmente hanno eccezionali proprietà e proprio per questo il loro uso è molto diffuso nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo. Il loro impiego, infatti, permette di apportare enormi vantaggi in quanto, al netto della presenza di eventuali ioni vicarianti, hanno formula bruta identica a quelle naturali ($[Ca_{10}(PO)_4(OH)_2]$), eccellenti biomimetici, osteoinduttività e osteoconduttività, nonché bassissima tossicità. Il beneficio derivante dalla realizzazione di scaffold basati sulle HA mediante stampa 3D risiede quindi nella possibilità di controllare accuratamente la struttura tridimensionale, gestendo appunto la geometria dell'impianto, e la dimensione e la forma dei pori. Tuttavia, come nel caso dei vetri biologici, questi materiali sono caratterizzati da scarse proprietà meccaniche e da un lento rateo di degradazione, che li rendono inadeguati all'impiego in zone anatomiche di sostegno.

Il fosfato tricalcico (TCP), soprattutto nella forma β , è invece il materiale ceramico più utilizzato nell'ambito della realizzazione di scaffold mediante stampa 3D. Questo composto differisce dalle HA principalmente per fattori come la composizione stechiometrica ($[Ca_3(PO_4)_2]$), l'ambiente di formazione (HA si forma in ambiente umido a $T < 900^\circ C$, mentre TCP in ambiente secco $T > 900^\circ C$), la velocità di degradazione (maggiore nel TCP) e gli effetti dovuti alla presenza di ioni vicarianti.

Analizzando le sue proprietà, si possono distinguere tre forme allotropiche: α_s , α , e β . In realtà, le prime due sono di scarso interesse nel problema dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, e, quindi, ci si limita ad affermare che la loro formazione è ottenibile per transizione dalla fase β ; una volta che questa è sottoposta a temperature maggiori di $1290^\circ C$.

La stabilità del β -TCP fino a queste temperature lo rende un candidato ideale anche per l'impiego in processi di sinterizzazione (impossibili da sopportare per le HA), seppure sia comunque necessario procedere con cautela per evitare possibili trasformazioni di fase indesiderate, da β ad α .

Oltre a questo elemento distintivo, di questo composto vengono apprezzate soprattutto le buone proprietà meccaniche e la veloce bioriassorbibilità, che consentono di creare scaffold compositi (specialmente in combinazione con HA) con un rateo di degradazione progressivo e controllabile nel tempo. Ulteriori vantaggi sono identificabili nella biocompatibilità e nell'osteoaduttività.

Nonostante tutto ciò, nella progettazione bisogna porre particolare attenzione ai fenomeni di rottura. Infatti, nel caso in cui avvengano eventuali microfratture o fenomeni transizione di fase al suo interno (provocanti variazioni di volume che inducono la propagazione di cricche), il β -TCP dimostra una tenacità pressoché nulla. Da ciò si intuisce quanto sia rischiosa la sua applicazione in vivo come materiale puro.

L'ultima considerazione degna di nota riguarda le eventuali impurezze della microstruttura e i loro possibili effetti. Infatti, se durante la produzione delle HA avviene l'inclusione (anche accidentale) di ioni estranei alla struttura cristallina ideale, si rischia di incorrere in conseguenze anche disastrose. Nel dettaglio, se durante la fase di stampa vengono incorporati all'interno della struttura ioni F^- , si assiste alla stabilizzazione della fase apatitica; mentre, se viene inglobato anche solo uno degli ioni Mg^{2+} , $P_2O_7^{4-}$, Sn^{2+} , Al^{3+} viene stabilizzato il β -TCP, con destabilizzazione della fase apatitica. Infine, se, e solo se, è assente il catione Mg^{2+} e si opera a basse temperature, è possibile procedere alla sostituzione di PO_4^{3-} (contenuto nelle HA) con lo ione CO_3^{2-} , anch'esso stabilizzante del β -TCP, ma non destabilizzante della struttura apatitica.

Di conseguenza, si intuisce facilmente come sia di estrema importanza ottenere una condizione di elevata purezza e assenza di contaminazioni per tutta la durata del processo di stampa, in quanto, la presenza anche solo in minima parte di TCP nelle polveri di HA o di altri componenti indesiderate, può avere un effetto negativo sulla struttura microcristallina e, a cascata, sulle proprietà fisico-chimiche macroscopiche.

Da un punto di vista clinico l'impiego delle HA è solitamente limitato alla realizzazione di coating superficiali o come componente di materiali compositi, mentre in vitro i test possono spaziare maggiormente. Infatti, alcuni scaffold compositi di Zn/HA (zinco/idrossiapatite) hanno dimostrato un buon tasso di degradazione, di sopravvivenza cellulare e di formazione di nuovo tessuto osseo [2]; altri, dopati con particelle di rame (Cu-doped HA), hanno esibito buone proprietà meccaniche e antibatteriche, nonché bassa citotossicità [32]. La prospettiva più interessante nell'ambito dei CSD mandibolari deriva però da un test sugli animali, basato sull'impiego di un composto formato al 90% da HA. Questo, noto come Hyperelastic Bone[®], ha garantito la stimolazione della produzione di

collagene di tipo 1 e di VEGF, a cui è seguita una successiva mineralizzazione del tessuto neoformato [2].

Invece, per quanto riguarda il TCP, sono stati testati a livello preclinico supporti in β -TCP puro al 100%, su alcuni topi. Dai dati rilevati, si sono osservati esiti straordinari: in questo studio [2] si è riusciti ad ottenere la formazione di nuovo tessuto osseo, addirittura con proprietà meccaniche comparabili all'osso originale, senza l'evidenza di reazioni immunitarie avverse.

Tuttavia, allo stato attuale, nella letteratura scientifica sono assenti studi clinici relativi al trattamento di CSD mediante l'impiego di fosfati di calcio su esseri umani, e pertanto non è possibile riportare alcuna testimonianza [2], [5], [22], [28], [32], [52].

4.2.2 *Trattamenti post-printing per i materiali ceramici*

Come citato nella premessa, anche i materiali ceramici possono essere sottoposti a trattamenti post-printing per migliorare le loro prestazioni in vivo. Infatti, se dal lato pre-printing si può intervenire sulle proprietà biologiche e fisico-chimiche mediante un'accurata progettazione della dimensione, interconnessione e forma dei pori, e con l'aggiunta di elementi (quali magnesio, manganese, stronzio e molibdeno), nei trattamenti post-printing ci si limita al trattamento della superficie esterna.

Questi trattamenti, volti alla funzionalizzazione della parte più esterna dello scaffold, possono essere di natura fisica o chimica, con alterazioni relative alla carica superficiale, ai gruppi funzionali e/o all'inclusione di biomolecole. A tal proposito, allo stato attuale, l'inserimento di biomolecole all'interno delle polveri di sinterizzazione o nelle bioresine (nello stadio precedente alla stampa), risulta mantenere scarsa efficacia rispetto all'obiettivo preposto. Infatti, le alte temperature raggiunte durante il processo di stampa, o durante il riscaldamento successivo (nel caso dei ceramici ottenuti da bioresine), impediscono il mantenimento delle proprietà originarie dei composti, con prodotti finali privi dei requisiti desiderati.

Questi requisiti, oltre ad essere relativi alle proprietà meccaniche e biologiche, possono riguardare anche le capacità antimicrobiche o l'effetto antitumorale dello scaffold, ma, ora come ora, per i composti più promettenti in tal senso (derivanti dai Carbon Nanomaterials, CNMs) non è ancora stata confermata in maniera univoca l'assenza di tossicità [22], [32], [53].

4.3 **Materiali polimerici**

Data l'enorme varietà di polimeri, questa categoria di materiali è in assoluto la più ampia e con le maggiori possibilità di sviluppo e successo nell'ambito della rigenerazione tissutale. Prima di analizzare i rispettivi pro e contro del loro impiego, si ricorda che la loro compatibilità con le tecniche di 3D printing dipende strettamente dalla natura del composto. Esistono quindi polimeri che sono

utilizzabili solo nelle condizioni in cui avviene il cell-laden bioprinting (come acido ialuronico, alginato e gelatina) e altri che invece possono essere impiegati anche in tecniche di cell-free printing (come PEEK, PLA e PCL).

Nell'ambito del cell-laden bioprinting, per la realizzazione degli scaffold, si usano i cosiddetti bioink (vedi paragrafo 3.3), contenenti i materiali scelti (polimeri ed eventualmente metalli e/o ceramici), a cui possono essere unite cellule e fattori di crescita. Inoltre, i recenti sviluppi nel settore dei materiali polimerici hanno permesso di creare, oltre ai polimeri non igroscopici, una vasta gamma di idrogel che si sono rivelati particolarmente promettenti nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo. Il vantaggio sostanziale degli idrogel (definibili come una rete tridimensionale di molecole polimeriche interconnesse, con spiccate proprietà igroscopiche e biomimetiche) consiste nel fatto che possono simulare lo stato idratato dei tessuti, senza che l'assorbimento di grandi quantità di acqua ne provochi la dissoluzione. Ciò, unito alla possibilità di controllarne la permeabilità, costituisce un enorme vantaggio e permette una miglior diffusione dei soluti nel volume occupato dallo scaffold. Tuttavia, prima di analizzare nel dettaglio i vari composti, è necessario effettuare un'ulteriore classificazione, questa volta correlata all'origine dei materiali polimerici. In questo caso, si dividono i materiali polimerici in: derivati naturali (come alginato, collagene e gelatina) e sintetici (come PEG, PLGA e Pluronic-F127®).

In generale, i principali benefici che l'impiego dei polimeri apporta nella formazione di nuovo tessuto osseo sono l'ottima biocompatibilità e biomimeticità, a cui si sommano, in alcuni casi, una maggior bioattività, un basso costo e la facilità di stampa (in quanto sono sufficienti basse temperature). Tuttavia, rimane particolarmente complesso ottenere scaffold in grado di coniugare buone proprietà biologiche e meccaniche, che abbiano inoltre un rateo di degradazione controllabile e comparabile al tasso di crescita del nuovo tessuto osseo. Infine, si ricorda anche la difficoltà di gestire la rapidità di solidificazione del bioink (mediante crosslinking), che costituisce però un fattore essenziale per migliorare l'accuratezza, la stabilità e la resistenza meccanica dei prodotti finiti.

Questi lati negativi ovviamente limitano l'applicazione di questi materiali in forma pura, rendendo difficile il loro utilizzo, in maniera esclusiva, nel trattamento dei CSD [22], [40], [42], [54], [55].

In questo paragrafo, partendo dalla descrizione delle caratteristiche ideali dei bioink, si presentano sinteticamente le varie tipologie di cellule, fattori di crescita e meccanismi di crosslinking; fino a giungere all'analisi dei polimeri sintetici e naturali impiegabili per la stampa 3D, per il caso dei CSD. Si precisa fin da subito che tutti i composti citati sono tutti biocompatibili.

4.3.1 Caratteristiche dei bioink

Come accennato in precedenza, il primo obiettivo del bioprinting per la realizzazione di scaffold da impiantare in vivo, è la stampa simultanea dei materiali di sostegno, delle cellule e dei fattori di crescita, tutto incorporato in un'unica struttura. Con questo approccio quindi si vuole creare un'entità autonoma contenente tutto il necessario per la crescita e la maturazione del tessuto osseo, da trasferire poi nelle applicazioni in vivo. Tuttavia, affinché sia possibile la crescita del tessuto (e quindi il successo dell'intervento) è necessario generare una regione in cui siano compresenti la matrice ossea, il relativo sistema di vasi sanguigni e, idealmente, anche innervazione. Allo stato dell'arte, pure se negli anni sono stati fatti notevoli passi avanti, un prodotto simile è impossibile da realizzare.

Alcuni studiosi hanno cercato di spingersi oltre, adottando un approccio alternativo, privo di ogni supporto (e pertanto denominato scaffold-free), in cui le cellule vengono lasciate libere di assemblarsi autonomamente, così da generare una struttura il più simile possibile ad un tessuto. Purtroppo, però, questa tecnologia è limitata da problemi legati all'integrità strutturale (completamente assente nelle prime fasi), alla perfusione (oltre i 400 μm di dimensione dell'agglomerato si assiste alla morte delle cellule più interne) e al tempo stesso impiegato per la crescita del tessuto (completamente inadeguato al trattamento di CSD) [55], [56]. Pertanto, a seguire, si analizzerà in maniera esaustiva solamente la prima modalità, basata sull'impiego degli scaffold.

Affinché si possa realizzare uno scaffold stampato in 3D applicabile nel corpo umano, è necessario che il bioink goda (almeno) di alcuni di questi requisiti fondamentali: biocompatibilità, facilità di stampa, adeguata cinetica di degradazione (analoga alla velocità di ricrescita del tessuto osseo), buone proprietà meccaniche e integrità strutturale, buona fedeltà al modello originario, assenza di tossicità (sia immunotossicità, sia citotossicità), biomimeticità (e quindi capacità di promuovere adesione, proliferazione e interconnessione multi-cellulare) e infine basso costo.

Allo stato attuale, un bioink dotato di tutte queste caratteristiche non esiste e, pertanto, identificare i materiali adeguati e la loro composizione esatta rappresenterebbe un punto di svolta. Tuttavia, questi requisiti sono dipendenti in maniera sinergica dalla tecnologia di stampa adottata, dalla concentrazione e dal tipo di cellule utilizzate, e dai materiali di base del bioink [54], [55].

4.3.1.1 Comportamento reologico

Nella Tabella 3.3 sono già state descritte le peculiarità principali richieste ai bioink, peraltro suddivise per singola modalità di stampa, ma non in maniera sufficientemente approfondita. Di seguito, si elencano brevemente le proprietà che i bioink, e i substrati su cui vengono depositi, devono possedere:

- EBB: fluido pseudoplastico con comportamento tissotropico (non-newtoniano), di viscosità compresa fra $30 - 6 \cdot 10^7$ mPa/s, con contenuto cellulare anche maggiore di 10^8 cellule/mL.

Deve possedere bassa tensione superficiale e adesività, e un meccanismo di solidificazione rapido, rispettivamente per evitare l'ostruzione dell'ugello e la perdita di fedeltà rispetto al modello CAD. Il substrato deve avere alta rugosità superficiale e bassa bagnabilità per agevolare il mantenimento della forma;

- DBB: fluido dilatante con comportamento reopectico (non-newtoniano), di viscosità compresa fra 3.5 e 12 mPa/s, per la tecnologia termica e piezoelettrica; e minore di 200 mPa/s per quella a micro-valvola. Deve possedere natura non fibrosa, contenuto cellulare minore di 10^6 cellule/mL, adeguata tensione superficiale e un meccanismo di solidificazione rapido. Questi ultimi due fattori permettono rispettivamente di confinare il bioink all'interno della cartuccia, evitando fuoriuscite accidentali, e di mantenere la fedeltà al modello CAD quando espulso. Il substrato deve evitare fenomeni di dispersione, schizzi o unione involontaria di gocce stampate distintamente;
- LIFT: fluido altamente viscoelastico, di viscosità compresa fra 1 e 300 mPa/s, con capacità di trasformare facilmente l'energia termica in cinetica, così da poter stampare in maniera accurata solo i singoli punti desiderati. Deve possedere bassa tensione superficiale e sufficiente adesività, e un meccanismo di solidificazione rapido, rispettivamente per consentire l'adesione al piano donatore ed evitare la perdita di fedeltà al modello CAD quando stampato. Può contenere al massimo 10^8 cellule/mL;
- VP: fluido contenente fotopolimeri non tossici, con viscosità variabile, compresa fra 10 e 5000 mPa/s per DLP e CLIP, e minore di 90 000 mPa/s per volumetric printing. Questi valori sono legati rispettivamente alla necessità di scongiurare la sedimentazione delle cellule e ad evitare che avvengano perturbazioni nella bioresina durante la rotazione del catino. Inoltre, può contenere al massimo 10^8 cellule/mL e deve possedere un meccanismo che consenta una rapida solidificazione [22], [40], [55].

Nelle varie modalità di 3D printing descritte, il numero di cellule stampabili per millilitro dipende strettamente dal comportamento reologico richiesto al fluido. Infatti, l'inserimento della componente cellulare tende ad aumentare la viscosità ed è quindi accompagnato da un incremento del rischio di ostruzione degli ugelli. Tuttavia, l'innalzamento della viscosità stessa può anche essere un fattore positivo, in quanto, secondo alcuni studi, sarebbe correlato ad una maggiore probabilità di sopravvivenza cellulare. Dunque, si deve optare per un trade off fra il tasso di sopravvivenza (modificabile anche con altri parametri come il diametro dell'ugello, temperatura e pressione di stampa) e la facilità di stampa [23], [38].

4.3.1.2 Linee cellulari

In generale, le cellule inseribili nei bioink sviluppati per l'ambito ortopedico possono essere di due tipi: specializzate (come osteoblasti, Human Umbelical Vein Endothelial Cells (HUVECs) ed Endothelial Cells (ECs)); oppure indifferenziate (come Mesenchymal Stem Cells (MSCs)). In particolare, mentre l'impiego di cellule specializzate rende possibile realizzare strutture operative già fin dai primi istanti, l'uso di cellule staminali consente di ottenere una struttura funzionale solo dopo un certo tempo, ossia a seguito della loro differenziazione in diverse tipologie di cellule.

Quindi, sebbene ogni linea cellulare abbia i propri benefici, i loro difetti sono particolarmente difficili da gestire. Nello specifico, affinché le cellule specializzate possano essere inserite nello scaffold, è necessario stampare in parallelo più bioink, ciascuno specifico per ogni tipo, necessità che incrementa notevolmente la complessità del processo. Allo stesso modo, nei bioink contenenti le cellule indifferenziate è necessario includere i fattori di crescita, facendo in modo che questi agiscano esclusivamente sulle cellule bersaglio, senza che avvengano fenomeni di ossificazione ectopica.

In entrambi i casi, si preferisce comunque prelevare le cellule direttamente dal paziente (Figura 4.2), in modo tale da fornire un trattamento specifico per ogni soggetto ed evitare risposte immunitarie indesiderate ed eventuali complicazioni.

Quindi, le principali tipologie di linee cellulari studiate per il trattamento di CSD, con effetti osteogenici e angiogenici, sono:

- MSC (Mesenchymal Stem Cell), la più promettente e più utilizzata linea di cellule staminali. Tali cellule sono capaci di differenziarsi in adipociti, condrociti, osteoblasti o cellule neuronali; hanno effetti antinfiammatori, permettono di ridurre il tempo necessario alla rigenerazione ossea e aumentano le probabilità di successo dell'intervento. La facilità del loro ottenimento dai tessuti (midollo osseo (BMSC), tessuto adiposo (ASC) e cordone ombelicale) non è però corrisposta dal numero di cellule isolate e quindi è necessaria una successiva espansione;
- EC (Endothelial Cell) e HUVEC (Human Umbelical Vein Endothelial Cells), sono linee cellulari differenziate, con potenziale angiogenico, estratte da individui adulti, e subito utilizzabili [23], [38], [52], [55], [57].

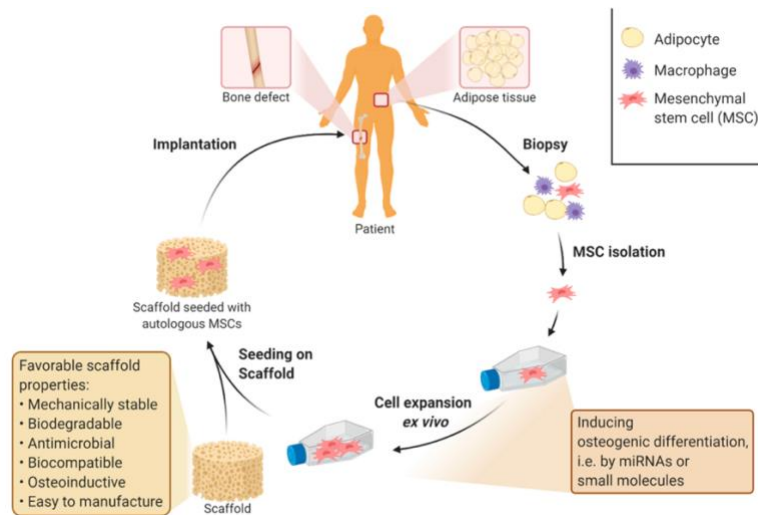


Figura 4.2: approccio per l'estrazione di MSCs e loro successivo impianto in scaffold apposti, finalizzato al trattamento di CSD [52].

4.3.1.3 Fattori di crescita

Approfondendo il tema della stimolazione osteogenica, angiogenica (creazione di capillari da vasi sanguigni preesistenti) e vasculogenica (creazione di vasi sanguigni ex novo, mediante differenziazione di cellule indifferenziate), non si può non menzionare l'uso di fattori biochimici.

Attualmente, nell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, i fattori biochimici più impiegati sono:

- TGF- β (Transforming Growth Factor - β), fattore di crescita stimolatore degli osteoblasti;
- BMP (Bone Morphogenetic Protein), sottocategoria dei TGF, stimola la proliferazione e differenziazione dei preosteoblasti ed accelera il metabolismo degli osteoblasti;
- IGF (Insulin-like Growth Factor), fattore stimolante della crescita e del metabolismo degli osteoblasti;
- FGF (Fibroblast Growth Factor), fattore stimolante della proliferazione e differenziazione cellulare nei contesti di angiogenesi e osteogenesi, e reclutatore di cellule del muscolo liscio per la formazione di vasi sanguigni;
- PDGF (Platelet Derived Growth Factor), fattore stimolante della differenziazione delle cellule staminali in linee cellulari osteogeniche e angiogeniche, e reclutatore di cellule del muscolo liscio per la formazione di vasi sanguigni.
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), fattore angiogenico per eccellenza, capace anche di promuovere processi di ossificazione, inducendo inoltre la neo-vascularizzazione [2], [5], [42].

4.3.1.4 Meccanismi di crosslinking

Affinché si possa realizzare uno scaffold stampato in 3D con adeguata integrità strutturale e fedeltà al modello CAD, è necessario porre attenzione anche ai meccanismi di reticolazione inter-catena (crosslinking). Queste interazioni permettono di controllare la rapidità di solidificazione del bioink migliorando così l'accuratezza dei prodotti finali. In generale, per la realizzazione di sostituti ossei, questi meccanismi sono classificabili in due categorie: meccanismi di tipo fisico e chimico. In realtà esistono anche quelli basati sull'impiego di enzimi, ma, essendo utilizzati soprattutto in ambito vascolare (per la formazione di idrogel di fibrina), si omette la loro trattazione.

Nello specifico, le interazioni dovute a fenomeni fisici permettono di ottenere la reticolazione fra le catene senza l'aggiunta di ulteriori sostanze potenzialmente tossiche o comunque aventi un effetto contaminante sulla purezza del composto. A questa categoria appartengono i meccanismi ionici (attrazione di molecole aventi carica opposta), le interazioni idrofobiche e i legami ad idrogeno. Ognuno di questi metodi è reversibile e tali legami possono essere rispettivamente sciolti tramite l'uso di sostanze chelanti o abbassamenti della temperatura in ambiente acquoso (in quanto alle alte temperature la forza delle interazioni idrofobiche delle catene polimeriche predomina su quella dei legami ad idrogeno). Il vantaggio principale di questo approccio risiede nell'elevata biocompatibilità del prodotto finale.

Il crosslinking di tipo chimico si basa invece sulla formazione di legami covalenti fra le molecole del bioink, eventualmente con l'ausilio di una molecola (crosslinker) che favorisce tale processo. Solitamente si basa su reazioni di condensazione, formazione di basi di Schiff (prodotto dell'addizione nucleofila di una ammina ad un gruppo carbonile) o sulla fotopolimerizzazione (indurimento della bioresina a seguito dell'esposizione a radiazione luminosa). In generale, in entrambi i casi, l'iniziatore è una molecola esterna e la sua concentrazione altera le proprietà finali dello scaffold: ad una maggiore quantità corrispondono migliori proprietà meccaniche, ma peggiore affinità biologica con le cellule. Come intuibile, il vantaggio di questi metodi risiede nell'ottima stabilità che forniscono alla struttura (determinata dalla presenza di legami forti fra le catene), contrastata però da un potenziale rischio di tossicità [55].

4.3.2 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici utilizzati in questo ambito sono generalmente molecole non igroscopiche, biocompatibili, con proprietà fisico-chimiche facilmente modificabili, dotate buona resistenza meccanica, ma scarsamente biomimetici e carenti della componente bioattiva [22], [39], [55]. Inoltre, nelle tecniche EBB, i bioink basati su questi polimeri solitamente presentano risoluzione minore di 0.5 mm, ad eccezione di PCL e PGLA che oscillano fra 0.1 mm e 1.7 mm [57].

Si indagano quindi alcuni casi notevoli: polichetoni, polieteri, poliesteri, poliacrilati e un polimero derivante dai polossameri. Si noti che possono essere stampati anche con tecniche cell-free printing.

4.3.2.1 Polichetoni (PEEK, PAEK)

I polichetoni sono una classe di polimeri caratterizzati dalla ripetizione di gruppi carbonili lungo la catena. Nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, i principali esponenti di questa categoria sono il PEEK (Polyether-Ether-Ketone) e la famiglia dei PAEK (Polyarylether Ketone), entrambi di origine sintetica.

Date le ottime proprietà meccaniche esibite da questi polimeri, il loro impiego nel trattamento di CSD non solo è possibile, ma è perfino già stato testato con successo (in alcuni casi) a livello clinico.

Il PEEK (Figura 4.3) è un polichetone semicristallino con comportamento termoplastico (quindi realizzabile mediante SLS e FDM) e classificato come polimero ad alte prestazioni. Nel dettaglio è caratterizzato da una bassa densità (1.3 g/cm^3), costo compreso fra i 25 – 70 €/kg, modulo di Young pari a 3.7 GPa, resistenza alla trazione fino a 90 MPa, allungamento a rottura fino al 50% e temperature di transizione e fusione rispettivamente pari a 143 °C e 343 °C.

Tutti questi vantaggi, uniti alla buona qualità ottenuta della ricostruzione finale del difetto osseo, lo hanno reso un materiale particolarmente ambito nel settore della sostituzione ossea, tanto che ora è considerato come una valida alternativa al titanio. Infatti, dato il minor divario (rispetto al titanio) fra il valore del modulo elastico dell'osso trabecolare e quello del PEEK, si riduce il rischio dell'occorrenza di fenomeni stress shielding. Tuttavia, questo aspetto è controbilanciato dalla concreta possibilità che, nel lungo periodo, l'accumulo delle tensioni residue all'interno della struttura del polimero conduca a deformazioni e delaminazioni fra gli strati. Sebbene questo lato negativo sia migliorabile mediante il rinforzo del PEEK con l'uso di fibre di carbonio (Carbon Fiber Reinforced, CFR), sono state riportate evidenze del fallimento di alcuni impianti compositi in CFR-PEEK a livello clinico.

Oltre a questi casi in CFR-PEEK, sugli esseri umani sono stati testati altri impianti realizzati esclusivamente in PEEK, con buoni risultati da un punto di vista sia funzionale, sia estetico [22], [58].

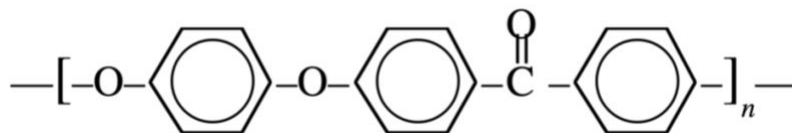


Figura 4.3: formula di struttura dell'unità ripetitiva del PEEK [58].

Analogamente al PEEK, i PAEKs sono una classe di polimeri ad alte prestazioni, con modulo elastico simile a quello osseo, ottima resistenza meccanica e buona osteointegrazione in vivo. Inoltre, possono

essere stampati in 3D via SLS, ma il loro utilizzo da un punto di vista clinico necessita di ulteriori studi per la conferma del successo del loro impiego.

L'area principale in cui possono essere utilizzati spazia dal trattamento di CSD, fino agli interventi in ambito craniofacciale. A tale famiglia appartiene peraltro anche il PEKK (Polyether-Ketone-Ketone), polimero di primaria importanza per le sue eccellenti caratteristiche [48], [53].

Nella Figura 4.4, si riporta l'esempio di un caso clinico di sostituzione ossea, ottenuto grazie all'utilizzo di un impianto realizzato in PEEK realizzato mediante stampa 3D.



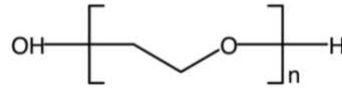
Figura 4.4: ricostruzione di una clavicola mediante l'utilizzo di un impianto realizzato in PEEK via 3D printing [22].

4.3.2.2 Polieteri (PEG)

I polieteri sono una classe di polimeri caratterizzati dalla ripetizione di gruppi etere lungo la catena, principalmente rappresentati dal PEG (Polyethylene Glycol) nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo. Peraltro, questo è anche il polimero idrofilico sintetico più utilizzato nelle applicazioni biomediche.

Il PEG (Figura 4.5) è un polietero approvato dalla FDA, generalmente lineare, con punto di fusione a 57.5 °C, idrofilico, non immunogenico, leggero (densità pari a 1.127 g/cm³), ma con scarse proprietà meccaniche e osteoconduttive.

Grazie alla flessibilità dei parametri produttivi (variazioni nel peso molecolare, architettura lineare/ramificata e tipi di gruppi funzionali) è possibile modificare le proprietà fisico-chimiche del PEG, adattandolo alle specifiche necessità. In particolar modo, la sua funzionalizzazione con sequenze RGD migliora notevolmente la capacità di adesione cellulare, ma, ciononostante, il PEG risulta essere normalmente restio all'adsorbimento proteico. Tale proprietà può anche essere estremizzata mediante un processo di PEGilazione, in cui il PEG viene legato ad altre biomolecole (spesso con fini terapeutici), consentendo di evitare legami indesiderati con altre proteine.



CAS Name
Polyethylene glycol

Figura 4.5: formula di struttura dell'unità ripetitiva del PEG [59].

Solitamente, per migliorare le proprietà meccaniche (e soprattutto la rigidità) del composto, si opera per mezzo di reazioni chimiche. Infatti, la modifica della composizione degli idrogel a base di PEG e l'impiego di foto-iniziatori consentono di ottenere dei derivati strutturalmente adeguati alla realizzazione di scaffold per il trattamento di CSD. Fra i materiali derivati dal PEG si menzionano: PEGMA (Polyethylene Glycol Methacrylate), PEGDA (Polyethylene Glycol Diacrylate) e PEGDMA (Polyethylene Glycol Dimethacrylate). Ciascuno di questi può essere usato in qualunque tecnica di bioprinting e la relativa solidificazione avviene per mezzo di fotopolimerizzazione con radiazione UV.

Attualmente il PEG, ma soprattutto i suoi derivati (date le notevoli proprietà meccaniche), sono ampiamente usati e testati in combinazione con i polimeri naturali, ma possono anche essere inseriti all'interno di bioink, insieme ad altri materiali. A prova di ciò, un test in vitro basato sull'uso della tecnologia DBB e di un bioink contenente PEGDMA e particelle di HA, ha fornito un riscontro positivo relativamente alla formazione di nuovo tessuto osseo [22], [40], [55], [59], [60].

4.3.2.3 Poliesteri (PGA, PLA, PLGA, PCL)

I poliesteri sono una classe di polimeri caratterizzati dalla ripetizione di gruppi esterei lungo la catena. Nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, i principali esponenti di questa categoria sono il PCL (Polycaprolactone), PGA (Polyglycolic acid), PLA (Polylactic acid) e PLGA (Poly(lactic)-co-glycolic acid).

Il PGA (Figura 4.6) è un poliestere alifatico biodegradabile, termoplastico (con punto di fusione a 200 – 220°C), idrofobico, ma scarsamente osteoconduttivo e con scarse proprietà meccaniche. Inoltre, presenta elevata biodegradabilità in vivo anche in assenza di enzimi o catalizzatori. A causa della combinazione di questa serie di svantaggi, il suo impiego in forma pura è assolutamente da evitare nell'ambito dei CSD.

Il PLA (Figura 4.6) è un poliestere leggero (densità pari a 1.21 g/cm³), economico (11.90-60 USD/kg) dotato di caratteristiche pressoché uguali al PGA, con le sole differenze riguardanti il punto di fusione (173°C) e il fatto che ha un carattere maggiormente idrofobico. A suo favore, la maggiore idrofobicità rende la sua degradazione in vivo meno rapida, tuttavia ciò non compensa gli altri suoi limiti. Quindi, anche il suo utilizzo in forma pura nel trattamento di CSD è assolutamente da evitare.

Il PLGA (Figura 4.6) è un copolimero del PLA e PGA, con caratteristiche migliori rispetto ai due presi singolarmente. Infatti, pur essendo anch'esso un polimero alifatico, biodegradabile, termoplastico e idrofobico, gode di migliori proprietà meccaniche e osteoconduttività rispetto ai precedenti. Tuttavia, a seguito della sua degradazione nei rispettivi monomeri PLA e PGA, esiste il rischio di una diminuzione locale del pH, accompagnato da un peggioramento del processo di osteointegrazione e da un incremento della probabilità che avvenga una risposta immunitaria indesiderata. Per questi motivi rappresenta un buon miglioramento rispetto al PLA e al PGA, ma si sconsiglia comunque il suo utilizzo singolarmente. [5], [38], [48], [52], [53], [59].

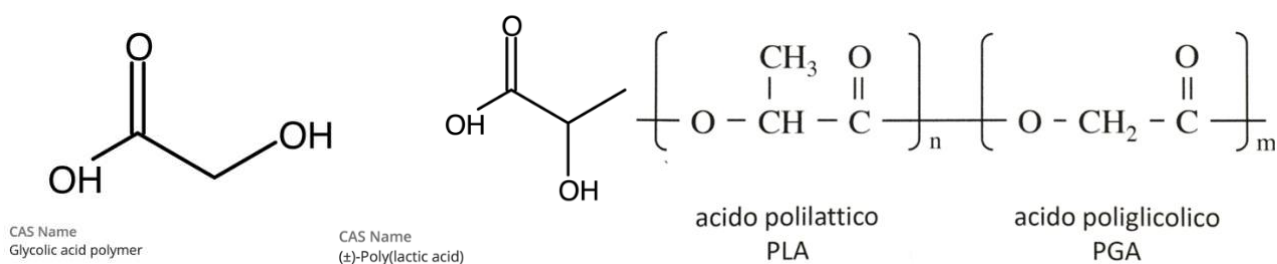


Figura 4.6: da sinistra a destra si osservano le formule di struttura delle unità ripetitive di PGA, PLA e PLGA [5], [59].

Come i precedenti polimeri, il PCL è un poliesteri alifatico, idrofobico, leggero (densità pari a 1.2 g/cm³) e termoplastico (temperatura di transizione vetrosa e di fusione rispettivamente pari a -60°C e 60°C), ma poco biodegradabile e scarsamente osteoconduttivo. Nonostante questi ultimi due svantaggi, è facilmente reperibile a basso costo, è facilmente lavorabile ed è dotato di ottime proprietà meccaniche, che lo rendono particolarmente adatto come materiale di supporto, nonché il polimero sintetico più usato nelle tecniche EBB.

Ad ogni modo, esattamente come il PLGA, l'impianto in PCL deve essere attentamente controllato per tutta la durata del suo impiego, in quanto il rilascio dei prodotti di degradazione determina un'acidificazione della zona adiacente. Infatti, siccome questo processo si protrae per tutta la permanenza del corpo esogeno, e dato che la degradazione totale dell'impianto richiede circa 2 – 3 anni, esiste un rischio concreto che i residui possano ostacolare la neomorfogenesi ossea. L'abbassamento del pH della zona limitrofa all'impianto può essere mitigato grazie all'inclusione di polimeri idrofilici, come PEG, o mediante la deposizione di coating superficiali.

Da un punto di vista produttivo, invece, le più recenti tecniche SLS permettono la realizzazione di prodotti in PCL ad alte prestazioni. In particolare, questi presentano una rigidità maggiore (15 – 300 MPa) rispetto al PCL convenzionale, ma comunque di gran lunga inferiore rispetto al necessario, come nel caso della mandibola (120 – 910 MPa) [22], [48], [53], [57], [59].

Date le buone proprietà meccaniche, il PCL può essere impiegato come elemento strutturale del bioink da stampare in 3D, a cui poi aggiungere cellule e altre biomolecole. In particolare, per ottenere

migliore bioattività, lo si può combinare con PLA o HA e, a tal proposito, una composizione pari al 70% di PLA e 30% di PCL (in peso) si è rivelata la migliore per la vitalità degli osteoblasti. Altre ricerche hanno dimostrato come la combinazione di PCL e particelle di HA abbia non solo proprietà osteoconduttive, ma anche antibatteriche [31], [52].

4.3.2.4 Pluronic® F-127

Pluronic® F-127 è il nome commerciale di un polimero sintetico derivato dai polossameri, la cui unità ripetitiva è costituita da due componenti idrofiliche e una idrofobica. Questa caratteristica lo rende un materiale tensioattivo (dunque in grado di abbassare drasticamente la tensione superficiale dei bioink) e quindi facilmente stampabile.

Data la sua natura pseudoplastica, termosensibile e altamente viscosa a temperatura ambiente, è particolarmente indicato per le tecniche EBB, ma fortemente sconsigliato per la DBB. Inoltre, l'assenza di un comportamento viscoelastico e l'incapacità di convertire facilmente l'energia termica in energia cinetica rendono il suo impiego pressoché impossibile nella tecnologia LIFT.

Indagando le altre qualità, si nota come sia inadeguato alla realizzazione di scaffold come materiale puro, in quanto dotato di scarse proprietà meccaniche e bassa biodegradabilità.

Oltre ciò, il Pluronic® F-127, essendo particolarmente sensibile alle variazioni di temperatura, tende ad indurirsi al crescere della temperatura e va incontro a liquefazione alle basse temperature. A tal proposito, affinché il processo di indurimento possa avvenire più rapidamente, si può indurre la formazione di reticolazioni inter-catena mediante irraggiamento UV, pure se con possibili effetti sulla sopravvivenza cellulare. Si ricorda che quest'ultimo fattore, oltre a dipendere dalla lunghezza d'onda della radiazione, è correlato anche alla concentrazione del foto-iniziatore e alla durata dell'esposizione.

Per migliorare i suoi punti deboli, si può intervenire con differenti metodi di crosslinking: infatti, mentre quello chimico incrementa la resistenza alla degradazione termica, quello enzimatico migliora le proprietà meccaniche.

Da un punto di vista applicativo, il Pluronic® F-127 è utilizzato nella stampa 3D principalmente per l'ambito vascolare e, pertanto, oltre ad essere usato come additivo nell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, questo polimero è spesso usato come bioink sacrificale nella realizzazione della componente vascolare del tessuto stesso. In particolare, sfruttando una tecnica di stampa coassiale, è stata dimostrata la possibilità di stampare con successo il Pluronic® F-127 all'interno di un altro idrogel, riuscendo a realizzare una rete interna di canali, aventi dimensioni fino a 45 µm. Una volta solidificati, abbassando la temperatura del sistema fino a 4°C, si è indotta la liquefazione del Pluronic® F-127,

consentendo la creazione di un network di condotti cavi interconnessi, successivamente popolati ed endotelializzati dalle HUVECs (Figura 4.7) [23], [55], [60].

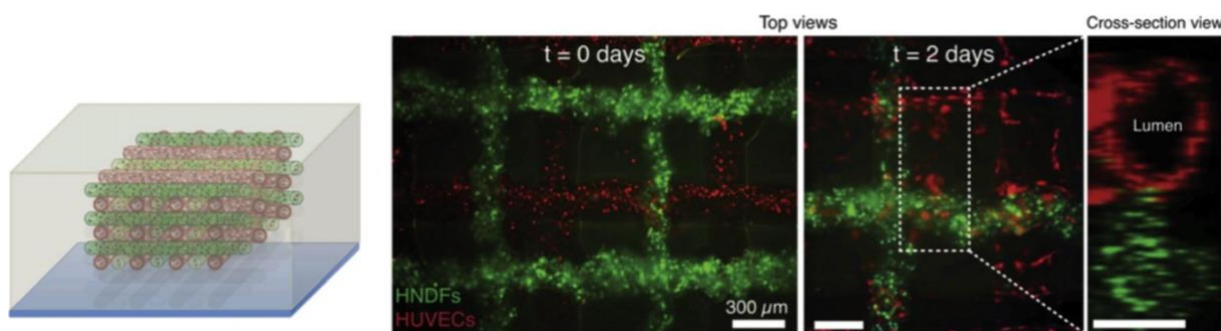


Figura 4.7: rete di condotti cavi interconnessi realizzati con l'ausilio del bioink sacrificale Pluronic® F-127 (rosso). Nelle sue vicinanze si può osservare la presenza dell'idrogel secondario, contenente le cellule stampate (verde) [23].

4.3.3 Polimeri naturali

I polimeri naturali utilizzati nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo sono generalmente molecole igroscopiche, biocompatibili, con eccellente bioattività e biomimetività, ma con proprietà fisico-chimiche difficilmente modificabili e bassa resistenza meccanica [22], [39], [55]. Inoltre, nelle tecniche EBB, i bioink basati su questi polimeri solitamente dimostrano risoluzione minore di 1.0 mm, ad eccezione dell'alginato e dell'acido ialuronico metacrilato (HAMA) che presentano invece un ampio intervallo di risoluzione, compreso fra 0.1 mm e 2.4 mm [57]. Fra essi, si approfondiscono le categorie dei polisaccaridi (fra cui figurano acido ialuronico, alginato e chitosano) e delle proteine (come collagene e gelatina).

4.3.3.1 Polisaccaridi

I polisaccaridi sono una classe di biopolimeri, definiti dalla ripetizione di legami glicosidici fra le unità ripetitive. Sono ottenuti per reazioni di condensazione successive e, per questa ragione, la loro natura è molto variabile. In particolare, le proprietà dei singoli polimeri dipendono da molti fattori quali il peso molecolare, la lunghezza della catena, la tipologia di unità saccaridica ripetuta, il tipo di legame acetalico e dal grado di ramificazione [5].

Nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, i polisaccaridi più utilizzati sono l'acido ialuronico, l'alginato e il chitosano.

L'acido ialuronico (Figura 4.8) è un eteropolisaccaride lineare di carattere anionico (un glicosamminoglicano) costituito dalla ripetizione di unità di acido D-glucuronico e N-acetilglucosammina, estremamente diffuso nei tessuti connettivi.

Il suo impiego nella realizzazione di scaffold stampati in 3D è principalmente dovuto alla sua eccellente biomimetività, idrofilicità e biodegradabilità. A questi pregi, si sommano inoltre la facilità

di controllo dell'architettura della catena carboniosa, delle relative proprietà meccaniche, del rateo di degradazione e del processo di adesione cellulare. Tutto ciò è possibile sia apportando modifiche ai suoi gruppi funzionali (carbossilico, ossidrilico e N-acetalico, ottenendo ad esempio l'acido ialuronico metacrilato (HAMA)), sia attraverso crosslinking fotochimico con radiazione UV.

L'insieme di queste qualità e della flessibilità nel processo di funzionalizzazione, ne fanno un additivo ideale per migliorare la biocompatibilità o alterare la viscosità di un bioink. Nonostante questa sua versatilità, lo ialuronato raramente viene usato come materiale puro per la realizzazione di scaffold, poiché, oltre all'elevato costo (£ 57 al grammo), esibisce una natura viscosa con comportamento pseudoplastico, e ha un lento processo di solidificazione.

Da queste ultime considerazioni si può facilmente intuire come sia adatto alla stampa mediante EBB e LIFT (in combinazione ad altri materiali), ma vivamente sconsigliato per la DBB. Ad ogni modo, anche nella EBB, la sua applicazione è limitata dalla lentezza di indurimento del materiale, che mette a rischio la fedeltà del prodotto finale rispetto al modello CAD originale [5], [22], [40], [55], [57].

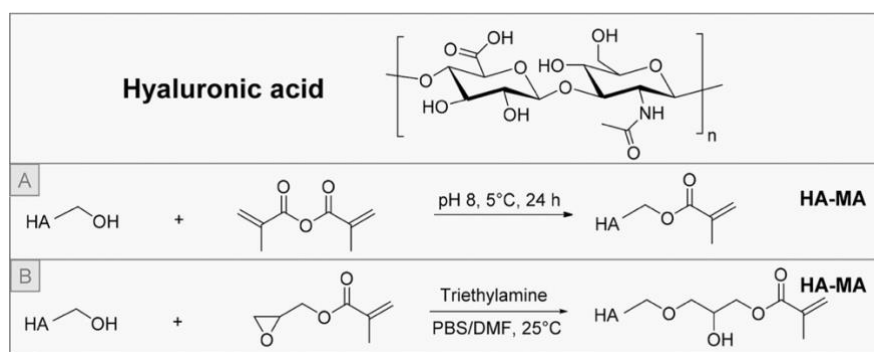


Figura 4.8: dall'alto in basso si vedono rispettivamente la formula di struttura dell'acido ialuronico e (in A e B) le possibili reazioni per ricavare l'HAMA [40].

L'alginato (Alg, Figura 4.9) è un eteropolisaccaride di carattere anionico composto dalla ripetizione di β -D-mannuronato (M) e α -L-gluronato (G). In virtù della sua origine naturale e dell'intrinseca natura anionica, risulta altamente biodegradabile e idrofilico, non immunogenico, facilmente lavorabile e reperibile a basso costo. Volendo approfondire quest'ultimo aspetto, e considerando che 1 kg di questo polimero costa meno di £100, si nota come sia possibile ricavare 50 litri di soluzione al 2% di alginato ad un prezzo sensibilmente inferiore rispetto all'acido ialuronico.

Complessivamente quindi, pur avendo scarse proprietà meccaniche ed un eccessivo rateo di degradazione in ambiente acquoso, è ritenuto un componente ideale per la realizzazione di idrogel da impiegare nella costruzione di scaffold; per tutte queste ragioni, è il polimero naturale più usato nelle tecniche EBB. Infatti, è stato provato come gli svantaggi non costituiscano un problema insormontabile, poiché possono essere parzialmente aggirati con l'apporto di opportune modifiche alla catena carboniosa oppure attraverso l'uso combinato di questo polimero con altri materiali di

sostegno. A tal proposito, la facilità di lavorazione consente di regolare agilmente la proporzione di subunità G nella catena principale, con conseguenti miglioramenti nel grado di solidificazione al crescere della loro presenza. Inoltre, l'impiego di meccanismi di reticolazione inter-catena mediante processi ionici (utilizzando CaCl_2 , CaSO_4 , o Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+}) consente di intervenire comodamente sulla facilità di indurimento del bioink, a patto però di accettare il rischio di dissoluzione della struttura stessa derivante dal possibile rilascio degli ioni. Dunque, onde evitare di incorrere nella reversibilità di questo processo, si può procedere con l'impiego di metodologie di crosslinking di tipo chimico, sfruttando il derivato dell'alginato AlgMA (Alginate Methacrylate), combinato alla fotopolimerizzazione con l'aggiunta di foto-iniziatori.

Le ultime considerazioni degne di nota riguardano la natura del composto in relazione all'adsorbimento proteico e alla facilità di stampa. In primo luogo, considerata l'intrinseca idrofilicità dell'alginato, si osserva raramente l'adsorbimento di proteine sulla sua superficie e pertanto, per semplificare il processo di adesione cellulare, frequentemente si funzionalizza il materiale con sequenze RGD.

Per quanto concerne la facilità di stampa, invece, si è osservato come questa dipenda strettamente dalla reticolazione delle catene e dalla concentrazione dell'alginato stesso. L'incremento di entrambi i fattori determina un aumento della viscosità del bioink, permettendo quindi l'impiego della tecnologia EBB. Questa è possibile per una concentrazione del polimero compresa fra il 2% e il 4% in volume e conferisce fedeltà al modello, stabilità strutturale e buona affinità biologica. Alternativamente, se si opta per mantenere bassa la concentrazione di alginato (inferiore al 2%), si può adottare la tecnica DBB. Ad oggi, non è noto l'uso della tecnologia LIFT [22], [40], [55], [57].

In conclusione, relativamente alle applicazioni in vitro, si è osservato come la combinazione alginato- CaCl_2 (molecola crosslinker) abbia mostrato un potenziale osteogenico e un'interazione fra cellule e matrice di gran lunga superiore rispetto a Alg- CaSO_4 , Alg-Gel (alginato - gelatina) e Alg-nanocellulosa.

Un ulteriore esperimento condotto con una tecnica di stampa EBB coassiale (Figura 4.10), utilizzando una pasta ceramica ad alta viscosità (come il nucleo interno) e un bioink di alginato e cellule a bassa viscosità reticolato poi con CaCl_2 (come rivestimento esterno), ha evidenziato un netto miglioramento nelle proprietà meccaniche e un alto tasso di sopravvivenza cellulare a lungo termine [22].

A conclusione di questa panoramica sull'alginato si può quindi affermare che gli idrogel da esso derivati presentano risultati promettenti e ampie prospettive di sviluppo nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo (mediante stampa 3D), ma per ora rimangono inadeguati all'impiego in siti anatomici soggetti a carichi esterni [22], [28].

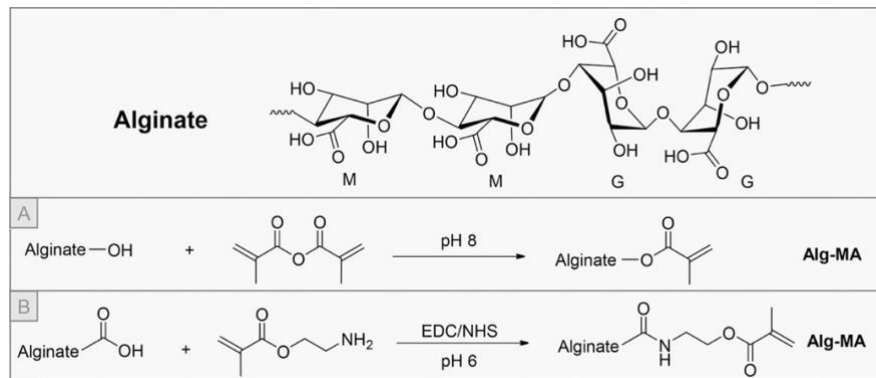


Figura 4.9: dall'alto in basso si vedono rispettivamente la formula di struttura dell'alginate e (in A e B) le possibili reazioni per ricavare l'AlgMA [40].

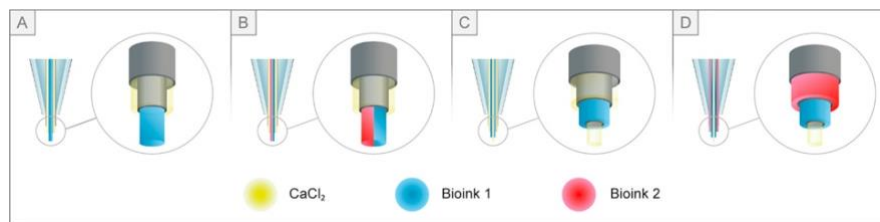


Figura 4.10: esempio di stampa EBB coassiale. (A) estrusione di bioink singolo sottoposto a rapida reticolazione per mezzo della guaina esterna di CaCl_2 ; (B) estrusione di una coppia di bioink, posti nello stesso filamento, avvolti da uno strato di CaCl_2 esterno; (C) stampa di strutture cave mediante l'uso di ugelli coassiali tripli con strato interno ed esterno di CaCl_2 e il bioink scelto posto in mezzo ad essi; (D) stampa di strutture cave a doppio strato attraverso l'impiego di ugelli coassiali tripli con CaCl_2 nella parte più interna del filamento, e i due bioink posti più esternamente [40].

Il chitosano (CS) è un eteropolisaccaride lineare derivante dalla deacetilazione parziale della chitina, costituito dalla ripetizione di unità N-acetil-D-glucosammina e D-glucosammina. Fra le proprietà fisico-chimiche si menzionano la bassa temperatura di fusione ($102.5\text{ }^\circ\text{C}$) e la leggerezza del composto (densità uguale a 1 g/cm^3) e si evidenziano la biodegradabilità, le proprietà antibiotiche e la pressoché totale assenza di tossicità. Purtroppo, oltre ai benefici, vi sono limitazioni associate alla difficoltà del processo di stampa. Il chitosano rivela infatti instabilità nelle proprietà meccaniche e, di conseguenza, una notevole difficoltà di realizzazione; pertanto, allo stato attuale, l'unica tecnica di bioprinting effettivamente testata con successo è la EBB.

Ad ogni modo, per contenere l'effetto di questi aspetti negativi e ricorrere anche altre tecnologie di AM, è stata proposta una modifica della struttura del chitosano. Si è osservato infatti che, funzionalizzando la molecola con un gruppo acrilato, è possibile ottenere il chitosano metacrilato (CSMA, Methacrylate Chitosan), ossia un composto che può andare incontro a reticolazione intercatena mediante l'utilizzo di radiazione UV o, previo l'utilizzo di particolari foto-iniziatori, con l'impiego della luce blu (405 nm). Quest'ultimo caso, testato con la tecnica DLP, ha attirato particolare attenzione e i suoi prodotti sono stati apprezzati per l'elevata risoluzione e accuratezza rispetto al modello CAD. Inoltre, l'analisi biologica ha rilevato minori danni alle strutture cellulari, come conseguenza diretta dell'assenza di radiazioni ad alta frequenza [22].

Altri test in vitro si sono focalizzati sulla ricerca della finestra ottimale di stampa mediante EBB, dimostrando che si ottiene la miglior risposta biologica dello scaffold per concentrazioni di chitosano pari a circa l'1.5% in peso. In questo caso, il grado di acetilazione delle molecole si attesta fra il 30% e il 40% [55].

Volendo infine tracciare un quadro complessivo di questo composto, esso risulta particolarmente utile nell'incapsulamento di cellule e molecole bioattive (come nei casi di drug delivery), ma sempre accompagnato da altri materiali di sostegno strutturale. Pertanto, il suo impiego come materiale puro, nel trattamento dei casi di CSD, è assolutamente da evitare [5], [22], [55], [59].

4.3.3.2 *Proteine*

Le proteine sono una classe di biopolimeri dall'elevato peso molecolare ottenuti per reazioni di condensazione fra amminoacidi e definiti dalla ripetizione di legami peptidici fra le unità ripetitive. Presentano una natura molto variabile a seconda del peso molecolare, della lunghezza delle catene e della tipologia di amminoacidi presenti (a cui sono correlati i gruppi funzionali esposti e la conformazione tridimensionale assunta) [5]. Nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, trovano largo impiego il collagene di tipo I e la gelatina.

Il collagene (Col, Figura 4.11) è la principale proteina strutturale della ECM organica del tessuto osseo e ne rappresenta circa il 90 – 96% in peso. Nello specifico si tratta di una proteina quaternaria con conformazione a super-elica destrorsa compatta, costituita dall'assemblaggio di tre catene α sinistrorse, ciascuna in struttura primaria (tropocollagene).

Grazie all'elevato grado di organizzazione della struttura, unitamente alla presenza di legami intercatena (ponte idrogeno), questa molecola è altamente stabile e presenta notevole resistenza meccanica e proprietà viscoelastiche. Inoltre, data la sua origine naturale, possiede un'eccellente biomimeticità, un'ottima biodegradabilità e facilita l'adesione cellulare (grazie alla presenza della sequenza RGD nella catena).

Il collagene di tipo I (la forma prevalente nel tessuto osseo), pur conferendo un'ottima resistenza a trazione, dimostra alcuni problemi critici relativi all'indurimento del bioink e alle tecniche di crosslinking alternative (a quella termica). In primo luogo, la gestione della sua solidificazione è estremamente complessa. Infatti, oltre ad essere un processo estremamente lento (tanto che, a 37°C, il suo completamento può richiedere fino a 30 minuti), questo meccanismo dipende anche dalla temperatura a cui la molecola stessa è sottoposta. Dalle osservazioni empiriche, risulta che il collagene di tipo I è restio a solidificare a basse temperature, forma strutture fibrose a temperature intermedie (o a pH neutro) e si denatura alle alte temperature. A livello concreto quindi, questo determina in una sedimentazione della componente cellulare depositata, con ovvie problematiche

durante la fase di maturazione dello scaffold. Pertanto, nonostante le ottime proprietà meccaniche delle singole molecole di collagene, la struttura complessiva necessita della presenza di ulteriori materiali di sostegno.

In secondo luogo, sfruttando altre tecniche di crosslinking (come la funzionalizzazione del collagene con gruppi acrilati fotosensibili) esiste il rischio di incorrere in solidificazioni precoci prima della deposizione del bioink stesso, o di sacrificare qualità come l'organizzazione strutturale, la bioattività o la biodegradabilità.

Attualmente quindi, è possibile stampare con successo scaffold a base di collagene mediante: EBB (pure se si consiglia l'uso combinato con altri materiali di supporto), DBB (si suggerisce l'uso della tecnica a micro-valvola data la natura fibrosa) e LIFT (nessuna indicazione particolare, dato che è un materiale adesivo e trasferisce facilmente l'energia termica) [22], [40], [55].

Concretamente, la realizzazione di scaffold basati sul collagene, in combinazione con l'uso di PLGA come nanocarrier per il fattore TGF- β , ha evidenziato una cinetica di rilascio promettente, analoga a quella della ECM naturale [2].

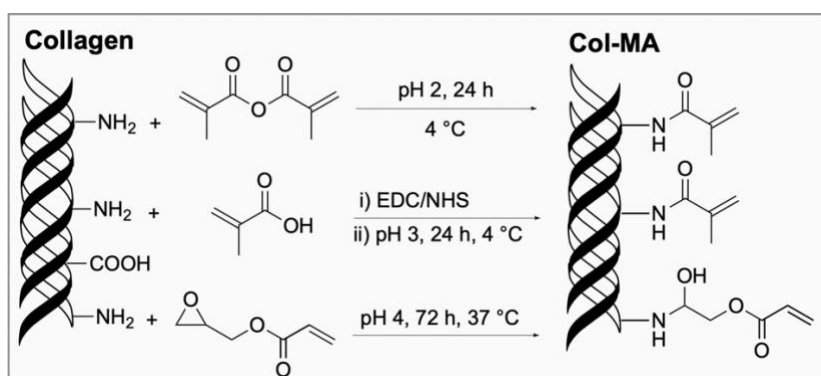


Figura 4.11: rappresentazione schematica della struttura del collagene e delle modalità di funzionalizzazione per ottenere una sua versione sensibile alla fotopolimerizzazione, anche nota come ColMA (Collagen Methacryloyl) [40].

La gelatina (Gel, Figura 4.12) è una molecola a singolo filamento derivante dall'idrolisi parziale della super-elica del collagene, approvata e riconosciuta come sicura dalla FDA.

I punti di forza di questo composto riguardano le eccellenti proprietà igroscopiche, la rapida biodegradabilità, il basso costo e la non immunogenicità. Peraltro, nonostante il processo di denaturazione subita, mantiene la sequenza bioattiva RGD, facilitando notevolmente l'adesione e la proliferazione cellulare. Tuttavia, dal momento che la transizione da gel a liquido avviene a 28°C, gli scaffold realizzati esclusivamente con questo materiale non sono strutturalmente stabili a temperatura ambiente e tendono a liquefarsi. Dunque, per evitare di incorrere nella dissoluzione completa del supporto, spesso si preferiscono i metodi di crosslinking enzimatici e chimici a quelli termici.

Nello specifico, funzionalizzando la gelatina con gruppi acrilati, è possibile ottenere il metacrilato di gelatina (GelMA) che si contraddistingue per le spiccate proprietà meccaniche e biomimetiche, per la facilità di combinazione con altri materiali e per la possibilità di solidificare mediante fotopolimerizzazione.

Per tutte queste ragioni, nonostante possieda un basso tasso di proliferazione cellulare, è il secondo polimero naturale (anche se alcuni lo considerano sintetico) più usato nella EBB.

Confrontando infine la gelatina e il GelMA in merito alle tecniche di stampa, si osserva come la gelatina sia utilizzabile con le tecnologie EBB, sconsigliata per la DBB e molto utile nella LIFT (per via della termosensibilità e viscoelasticità); mentre il GelMA sia spesso impiegato nella EBB e adottabile nella LIFT e nella DBB (grazie alla bassa viscosità a temperatura ambiente) [22], [40], [55], [57].

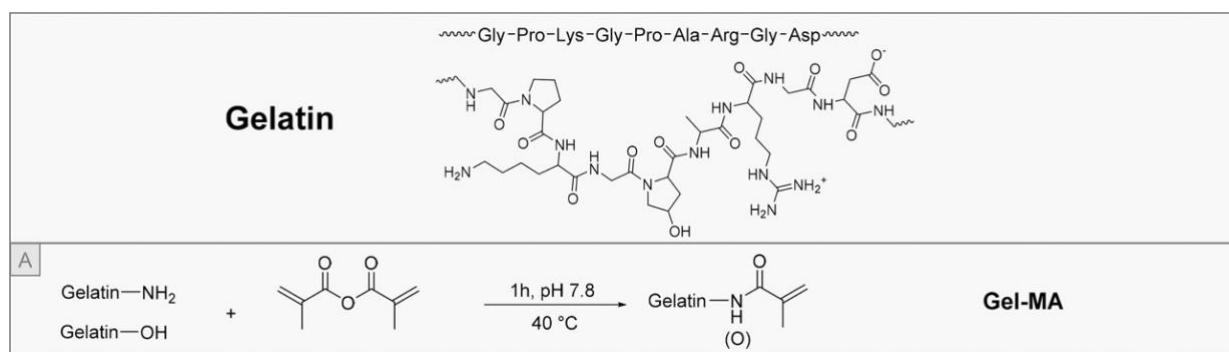


Figura 4.12: rappresentazione schematica della struttura della gelatina e della reazione per ottenere una sua versione sensibile alla fotopolimerizzazione, anche nota come GelMA (Gelatin Methacryloyl) [40].

Ovviamente, dal momento che il GelMA ha proprietà di gran lunga migliori rispetto alla gelatina, quest'ultimo composto raramente viene usato singolarmente nella pratica. Nonostante ciò, uno studio *in vitro* ha comunque sfruttato un bioink a base di gelatina, nano-HA, MSCs e HUVECs per realizzare con successo un modello di tessuto osseo vascolarizzato [42].

Passando alle applicazioni del GelMA, l'impiego della tecnica volumetric printing ha recentemente permesso di raggiungere un risultato straordinario nella stampa di scaffold 3D. Nel caso di Figura 4.13, il flusso di lavoro, iniziato con la scansione μ CT di un campione di osso trabecolare, proseguito con la relativa ricostruzione del modello virtuale, si è concluso con successo nella stampa della struttura (basata su una bioresina a base di GelMA e MSCs). Il tempo impiegato per la realizzazione di un'architettura così complessa, con porosità interconnesse e avente dimensioni pari a 8.5 mm x 9.3 mm, è stato di soli 12.5 secondi, con una risoluzione di $144.69 \mu\text{m} \pm 13.55 \mu\text{m}$. Inoltre, le cellule presenti sono state uniformemente distribuite, sono sopravvissute per oltre una settimana e l'aggiunta di ulteriori linee cellulari volte alla formazione dell'endotelio vascolare, ha permesso di osservare la creazione di una struttura multicellulare, con un principio di vasculogenesi [40].

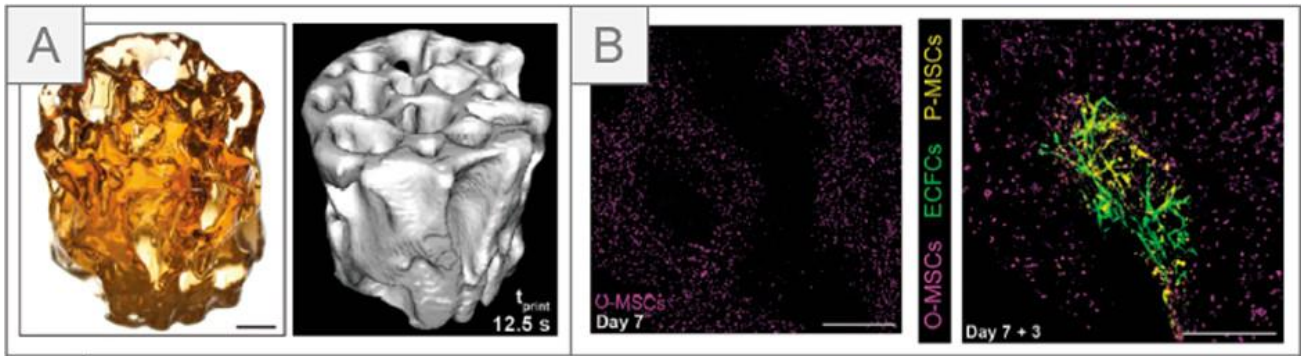


Figura 4.13: la parte (A) mostra una scala di riferimento di 2 mm; con il modello stampato dell'osso trabecolare (a sinistra); e la scansione μ CT di partenza (a destra). La parte (B) mostra una scala di riferimento di 1 mm; con evidenziate in rosa le MSCs originali, dopo 7 giorni (a sinistra); e la struttura multicellulare, dopo 3 giorni dall'inserimento delle altre linee cellulari evidenziate in giallo e verde (a destra) [40].

4.3.4 Trattamenti post-printing per i materiali polimerici

Considerata l'elevata variabilità del comportamento dei polimeri, la flessibilità nella scelta delle loro combinazioni e composizioni, nonché la vasta gamma di tecnologie produttive, i trattamenti post printing dei materiali polimerici assumono effettiva rilevanza solo se analizzati in riferimento ad alcuni aspetti. Fra questi rientrano il miglioramento delle proprietà superficiali dei sostituti ossei (p. es., PCL e PEEK), la maturazione dei tessuti all'interno di bioreattori, e infine il lavaggio da bioink sacrificali e/o da molecole di bioresina a seguito delle tecniche VP.

Come accennato per i metalli, anche per polimeri come il PEEK è possibile intervenire su idrofilità e rugosità superficiale e con trattamenti di sabbiatura o lucidatura, ma ciò è applicabile solo nei casi di cell-free printing. Infatti, dato che nel cell-laden bioprinting queste caratteristiche sono dei prerequisiti, l'impiego di trattamenti superficiali rischierebbe solo di danneggiare o contaminare gli scaffold e pertanto non sono necessari o rischiano di essere addirittura deleteri [22].

4.4 Trattamenti post-printing generici

Oltre ai trattamenti superficiali visti finora, specifici per i singoli tipi di materiali, esistono altre lavorazioni di carattere più generico e adatte a tutti i prodotti ottenuti per cell-free printing. In particolare, mentre in alcuni casi si tenta di migliorare l'osteointegrazione mediante la deposizione della componente cellulare sulla superficie del materiale (cell-seeding), in altri casi si vuole scongiurare il rischio di ogni possibile contaminazione e infezione in profondità attraverso la pulizia dello scaffold (p. es., rimozione di polveri residue dalla stampa 3D) o mediante l'uso della sterilizzazione (Figura 4.14). Ad ogni modo, questo processo non è immediato ma richiede dai 30 ai 120 minuti [21].

Scaffold Type	Advantages	Disadvantages	Fabrication Technique	Sterilization Method
Natural polymers	Biocompatibility Cell adhesion, proliferation, Angiogenesis Low immunogenicity Antimicrobial properties	Poor mechanical strength High biodegradability rate	Electrospinning Lyophilization Salt-leaching 3D printing (fused deposition modeling)	Supercritical carbon dioxide Lyophilization combined with gas plasma Peracetic acid Ethanol UV irradiation
Synthetic polymers	Biocompatibility Appropriate mechanical stability Controlled biodegradation rate	Lack of degradation (in the group of non-biodegradable polymers)	Salt-leaching 3D printing (fused deposition modeling) Fused deposition modeling Stereolithography	Plasma sterilization (Hydrogen peroxide) Supercritical carbon dioxide Ethanol Antibiotics Dry heat Electron beam irradiation Gamma irradiation UV irradiation Ethylene oxide
Hydrogels	Biocompatibility Osteoconductivity, Cell adhesion, proliferation Hydrophilic characteristics Porosity	Poor mechanical strength	Electrospinning 3D printing	Ethanol Ethylene oxide Autoclaving Supercritical carbon dioxide Lyophilization Electron beam irradiation Gamma irradiation UV irradiation
Bioceramic scaffolds	Biocompatibility Porosity Osteoconductive and osteoinductive properties High mechanical strength Individualized scaffolds Easily sterilized and visualized Controlled pore size	Brittle structure (HA)	Particle/salt leaching Gas foaming Phase separation Selective laser sintering Fused deposition modeling Electron beam melting Stereolithography	Steam Dry heat Ethylene oxide Electron beam irradiation Gamma irradiation UV irradiation
Metallic scaffolds	Biocompatibility High mechanical strength and stiffness Osteoconductive properties Ability to promote osteointegration Individualized scaffolds Easily sterilized and visualized Controlled pore size	Corrosion	Stereolithography Electron beam melting Selective laser melting	Steam Dry heat Ethylene oxide (ETO) Electron beam irradiation Gamma irradiation UV irradiation
Biological scaffolds	Biomimetic properties Identical microstructure and porosity	Foreign body and inflammatory response	Lyophilization	Supercritical carbon dioxide Gamma irradiation
Composite scaffolds	Combination of different scaffolds advantages and compensating disadvantages	Combination of different scaffolds advantages and compensating disadvantages Limited new bone formation	Electrospinning Lyophilization Particle/salt leaching Gas foaming Phase separation Additive manufacturing techniques (selective laser sintering, fused deposition modeling and electron beam melting) Stereolithography	Electron beam irradiation Gamma irradiation UV irradiation

Figura 4.14: rappresentazione schematica dei vantaggi, svantaggi, tecniche di produzione e di sterilizzazione dei vari tipi di scaffold [60].

Capitolo 5: Caso di studio

Come già visto, per alcuni materiali, la traslazione clinica dei prodotti realizzati con tecniche AM, non solo è possibile, ma è anche già avvenuta con successo. In particolare, gli impianti in titanio sono quelli finora più diffusi, date le loro ottime proprietà meccaniche, l'approfondita conoscenza del loro comportamento e la loro compatibilità con i parametri fisiologici.

Negli anni quindi, tutti questi vantaggi sono stati sfruttati appieno nella progettazione di protesi su misura per il trattamento di CSD, fino ad ottenere prodotti dalle ottime caratteristiche, confermate poi dai follow-up post-operatori dei pazienti.

Si riporta come caso di studio l'esempio di due casi di pazienti oncologici (rispettivamente di 62 e 64 anni) per i quali si è ritenuta adeguata l'adozione di questa soluzione.

Il primo paziente presentava una condizione originaria caratterizzata da una massa anomala in corrispondenza del polmone destro, diffusa anche nella corrispettiva parte anteriore della gabbia toracica. In questo caso, la crescita del tumore ha causato la distruzione della seconda e terza costola, invadendo la quarta.

Il secondo paziente, invece, mostrava la presenza di una massa anomala di $5 \times 5 \times 5 \text{ cm}^3$ posta centralmente rispetto alla gabbia toracica, che ha causato la distruzione dello sterno.

In entrambi i soggetti, non essendoci alcun segno di metastasi in altri siti anatomici, si è proceduto con la scansione della regione interessata, al fine di produrre una protesi stampata in 3D. Per ricavare il file immagine da utilizzare come base per la realizzazione del modello CAD (Figura 5.1), si è sfruttata la tecnologia CT di tipo elicoidale, con spessore della slice pari a 1.3 mm, spessore della slice da ricostruire uguale a 0.6 mm, matrice immagine avente dimensione 512×512 e tensione fra catodo e anodo pari a 120 kV (questo valore è noto solo per il primo caso).

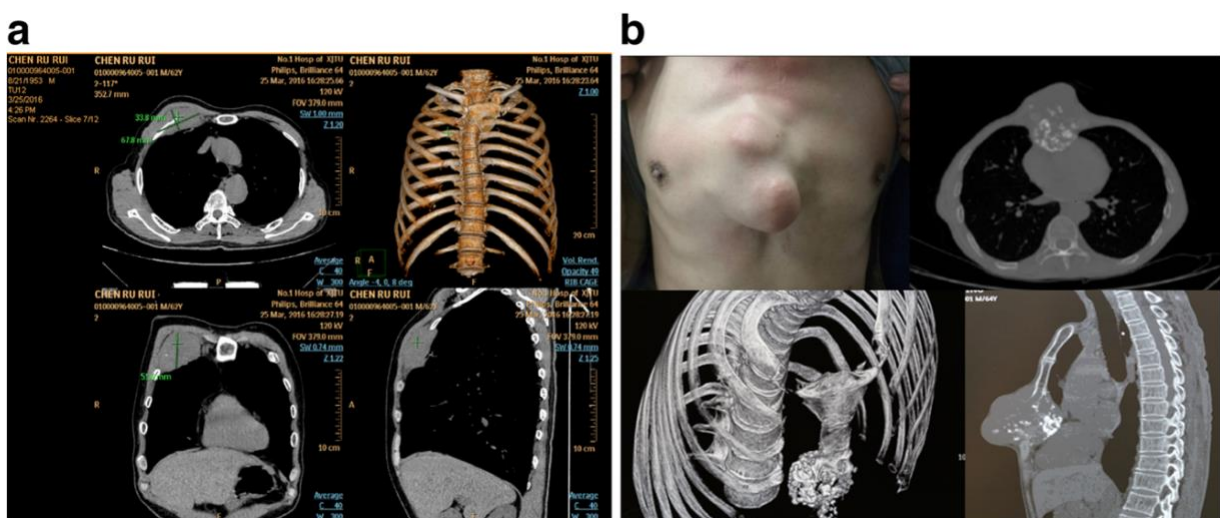


Figura 5.1: fotografie e scansioni dello stato patologico originario dei pazienti. Nel primo paziente (a) il tumore ha distrutto la seconda e la terza costola, compromettendo anche la quarta; invece, nel secondo (b), ha provocato la distruzione dello sterno [61].

A questa prima fase di acquisizione dell'immagine è seguita la progettazione dell'impianto (Figura 5.2). L'uso dei software MIMICS (Materialise Interactive Medical Image Control System; Materialise, Leuven, Belgium), Digisurf (3-D Family Corporation, Taiwan) e ANSYS (versione 5.7, ANSYS, Pittsburgh, USA) ha permesso rispettivamente di selezionare le regioni di interesse, rimuovendo quelle non necessarie (tessuti molli); di progettare la superficie dei prodotti finali; di condurre le opportune analisi FEM (Figura 5.3).

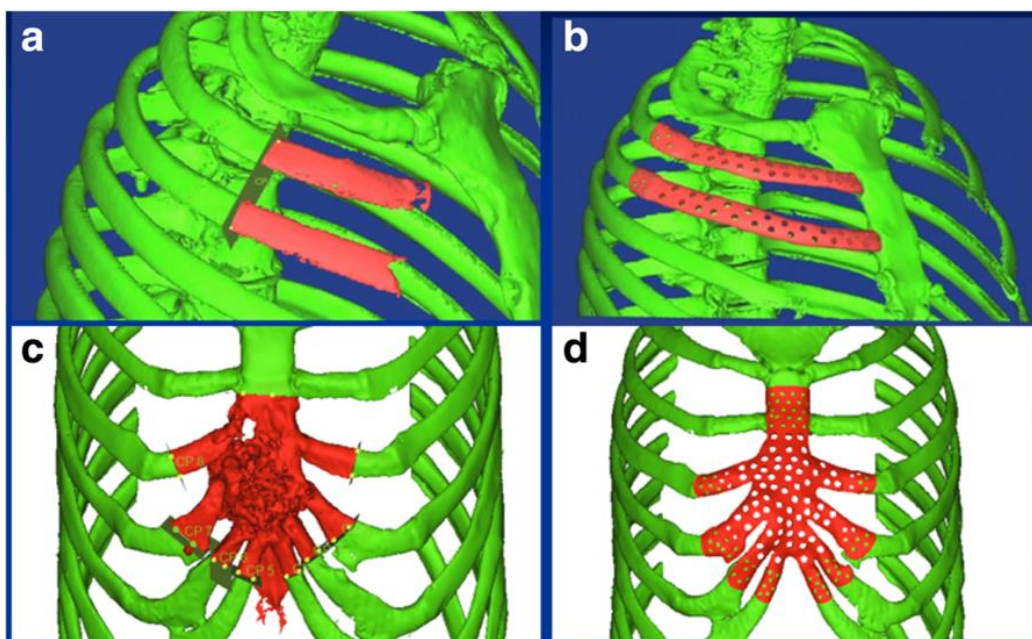


Figura 5.2: modello CAD dei difetti ossei dei pazienti in esame (a, c) e dei relativi impianti protesici (b, d) [61].

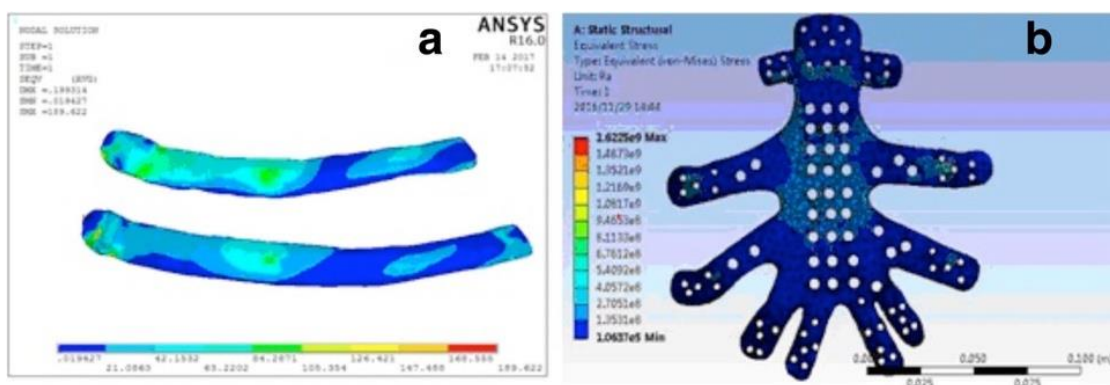


Figura 5.3: risultato delle analisi FEM (in MPa) effettuate sugli impianti del primo (a) e del secondo paziente (b) [61].

Una volta esportato il file STL, si sono dapprima realizzati i prototipi dei prodotti finali (mediante binder jetting), e, successivamente, i veri e propri impianti mediante una tecnica laser non meglio precisata. Ad ogni modo, dato che questo processo è avvenuto in atmosfera inerte con argon al 99.999% (per evitare l'ossidazione delle polveri di Ti6Al4V) e, considerato che il diametro delle particelle di era compreso fra 20 μm e 65 μm , si ritiene molto probabile che si trattasse di una

tecnologia SLM. Inoltre, in seguito, le protesi sono state sottoposte ad un trattamento di sabbiatura per migliorarne la rugosità e favorire l'osteointegrazione.

Una volta finito il processo di stampa, gli impianti sono stati sottoposti a test meccanici per verificarne le proprietà, ottenendo valori della tensione di snervamento e rottura rispettivamente pari a $950 \text{ MPa} \pm 14 \text{ MPa}$ e $1005 \text{ MPa} \pm 26 \text{ MPa}$. Nella Figura 5.4 si confrontano questi dati con quelli degli standard industriali per l'ambito chirurgico.

	Tensile strength (MPa)	Specified nonproportional extension strength, $RP_{0.2}$ (MPa)	Elongation rate (%)
3D printed titanium-alloy prosthesis	1002	819	13.3
Pharmaceutical industry standards from YY0117.1-2005	≥ 860	≥ 780	≥ 10

Note: The YY0117.1-2005 pharmaceutical industry standards are entitled "Surgical implants: bone prosthesis forging, casting -Ti6Al4V titanium alloy forgings"

Figura 5.4: proprietà meccaniche della lega di titanio stampata confrontata con gli standard industriali [61].

Complessivamente gli interventi chirurgici dei due pazienti hanno avuto un esito più che soddisfacente. Il follow-up a 6 mesi di distanza dall'innesto dell'impianto ha infatti dimostrato un accurato fissaggio dello stesso, l'assenza di mobilità (grazie anche all'impiego di fili d'acciaio e viti di ancoraggio), nonché l'assenza di deformazioni estetiche nella zona corrispondente (Figura 5.5).

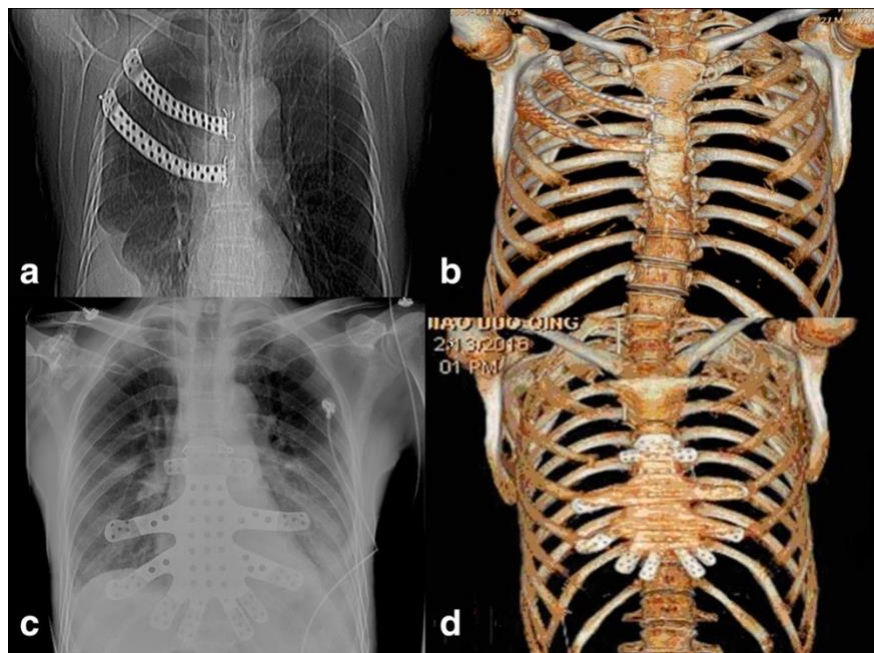


Figura 5.5: dall'analisi post-operatoria ai raggi X si può osservare la corrispondenza anatomica delle protesi (a,c); mentre dalla ricostruzione CT si nota la buona qualità del fissaggio in vivo [61].

A tutto ciò si aggiungono: una riduzione del tempo operatorio rispetto alle tecniche tradizionali (per il primo soggetto sono stati necessari solo 120 minuti); una ridotta emorragia intra-operatoria; l'assenza della necessità di modificare la protesi durante l'intervento (adattandola al paziente); la

possibilità di stampare modelli e eseguire una accurata pianificazione pre-operatoria; il basso costo (\$ 1200 per due costole, \$ 1300 per lo sterno).

Chiaramente, i limiti riguardano la complessità, il tempo necessario alla progettazione, il rischio di mobilità degli impianti dovuto ad infezioni e allentamento di viti, nonché la disponibilità di tutta la strumentazione e di personale qualificato [61].

Capitolo 6: 4D bioprinting

Nonostante gli enormi vantaggi offerti dall'applicazione dell'additive manufacturing in ambito biomedico, permangono alcune limitazioni non trascurabili. Infatti, oltre a quelle descritte nell'introduzione del Capitolo 3, il difetto principale della stampa 3D è quello di consentire solamente la produzione di strutture statiche e con geometrie ben definite nello spazio. Con ciò si intende affermare che lo scaffold non è sensibile a variazioni delle condizioni dell'ambiente esterno o interno, e pertanto non è adatto a replicare esattamente la struttura ossea nella sua dinamicità. Inoltre, possedendo una geometria esterna molto precisa, è notevolmente diverso da un riempitivo osseo (p. es., cemento osseo) che può permeare lo spazio vuoto e adattarsi alla zona lesa: pertanto, un'eventuale applicazione in vivo del bioprinting 3D necessiterebbe anche di un adattamento del sito anatomico interessato, in modo tale da renderla complementare all'impianto. Di conseguenza, gli studi più recenti si sono focalizzati sulla realizzazione di una tecnologia innovativa, capace di superare tutti questi ostacoli, e oggi definita come "Bioprinting 4D".

Nonostante non esista una definizione univoca di questo termine, alcuni ricercatori concordano nell'utilizzarlo per indicare il processo di generazione di scaffold, stampati con le attuali tecnologie 3D, in grado di rispondere a stimoli esterni e interni e di andare incontro a maturazione e funzionalizzazione nel tempo.

Allo stato attuale, in realtà, una "maturazione" dei prodotti del 3D bioprinting è già possibile all'interno dei bioreattori, anche se però va precisato che il supporto di base su cui crescono le cellule non varia per forma e funzioni nel tempo o in risposta agli stimoli esterni. Pertanto, tale definizione sarebbe impropria se riferita al meccanismo di crescita e proliferazione cellulare, ma comunque adeguata se volta a indicare l'impalcatura di base [56].

6.1 Tecnologie basate su variazioni di forma

Le tecnologie basate sulle variazioni di forma si classificano in due macrocategorie: quelle dipendenti da stimoli interni (Cell Traction Force, CTF) e quelle dipendenti da stimoli esterni (fisici, chimici, biologici). Nelle applicazioni future, idealmente, il loro impiego potrebbe permettere agli scaffold di adattarsi a qualunque forma complessa, ma, nella realtà attuale, alcuni problemi complicano questa prospettiva.

6.1.1 Scaffold reattivi a stimoli interni

Gli scaffold reattivi a stimoli interni sono supporti capaci di trasformare la propria forma in relazione alla forza di trazione esercitata dalle cellule. Questa è dovuta alla continua polimerizzazione dei filamenti di actina, e consente alla struttura di auto-ripiegarsi in precise forme predefinite [56].

6.1.2 Scaffold reattivi a stimoli esterni

Gli scaffold reattivi a stimoli esterni sono invece supporti capaci di trasformare la propria forma e configurazione microstrutturale in relazione alla variazione di parametri esterni di tipo fisico (campi elettromagnetici, umidità, stimoli acustici, radiazione luminosa, temperatura), chimico (pH o concentrazione di ioni) o biologico (azione enzimatica).

Nonostante i materiali impiegati possano avere natura molto diversa (polimeri polielettrolitici, nanoparticelle magnetiche, fotopolimeri, ...) le trasformazioni subite dagli scaffold sono generalmente riconducibili a transizioni sol-gel, rigonfiamento/sgonfiamento dovuto all'accumulo di acqua, polimerizzazione/degradazione e infine riorganizzazione configurazionale della struttura.

Fra tutte queste modalità di alterazione degli scaffold, quella attualmente più diffusa riguarda le transizioni sol-gel di polimeri anfifilici a seguito dell'applicazione di stimoli fisici di tipo termico. Il meccanismo di base prevede due casistiche, distinte a seconda della natura degli idrogel: UCST (Upper Critical Solution Temperature) e LCST (Lower Critical Solution Temperature) (Figura 6.1). Nella prima categoria di composti (UCST), il polimero si dimostra solubile al di sopra di una certa temperatura critica e può formare idrogel stabili solo al di sotto, mentre negli LCST avviene il contrario. Ciò è dovuto al fatto che, al variare della temperatura, le catene polimeriche possono organizzarsi in due forme differenti, ovvero possono disporsi ordinatamente in strutture idrofiliche a spirale, oppure compattarsi in strutture globulari idrofobiche. La diversa configurazione comporta ripercussioni non indifferenti sulle interazioni con le molecole di acqua, determinando di conseguenza la transizione da stato liquido (catene polimeriche distese) a gel (catene polimeriche compatte) [22], [56] (Figura 6.2).

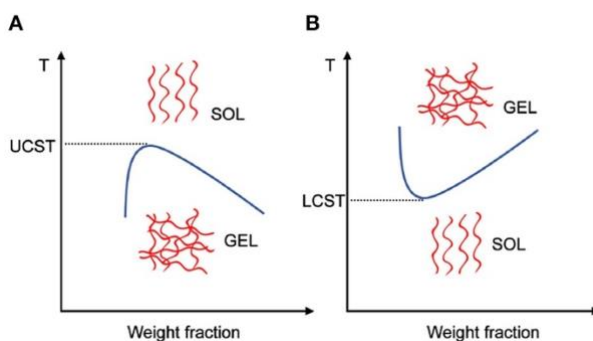


Figura 6.1: rappresentazioni schematiche del comportamento degli idrogel di tipo UCST e LCST con le indicazioni dei relativi stati che possono assumere al variare della temperatura e la curva di transizione sol-gel [62].

L'attuale maggiore esponente dei materiali utilizzabili in questo ambito (oltre alla gelatina) è il PNIPAm (Poly(N-isopropylacrylamide)). Purtroppo, però, questo materiale dimostra scarsa biocompatibilità, elevata idrofobicità, difficile degradabilità e richiede alte temperature per andare incontro a trasformazioni. Sfruttando alcuni suoi copolimeri si possono superare questi limiti, ma la

ricerca di materiali biocompatibili con esso combinabili o comunque adatti a questo tipo di applicazioni richiede ancora tempo [56], [62].

Per la necessità di trovare materiali alternativi si è fatto anche ricorso ai materiali a memoria di forma (Shape Memory Materials, SMM), che, seppure già noti, non possono però incorporare cellule e fattori biochimici al loro interno. Quindi, nonostante questi composti siano in grado di auto-attivarsi, auto-assemblarsi ed eventualmente auto-ripiegarsi e auto-ripararsi, a causa della impossibilità di includere la componente bioattiva in maniera uniforme in tutto il volume (e non solo sulla superficie), il loro impiego può essere valutato solo in qualità di componenti all'interno di materiali compositi [56], [63].

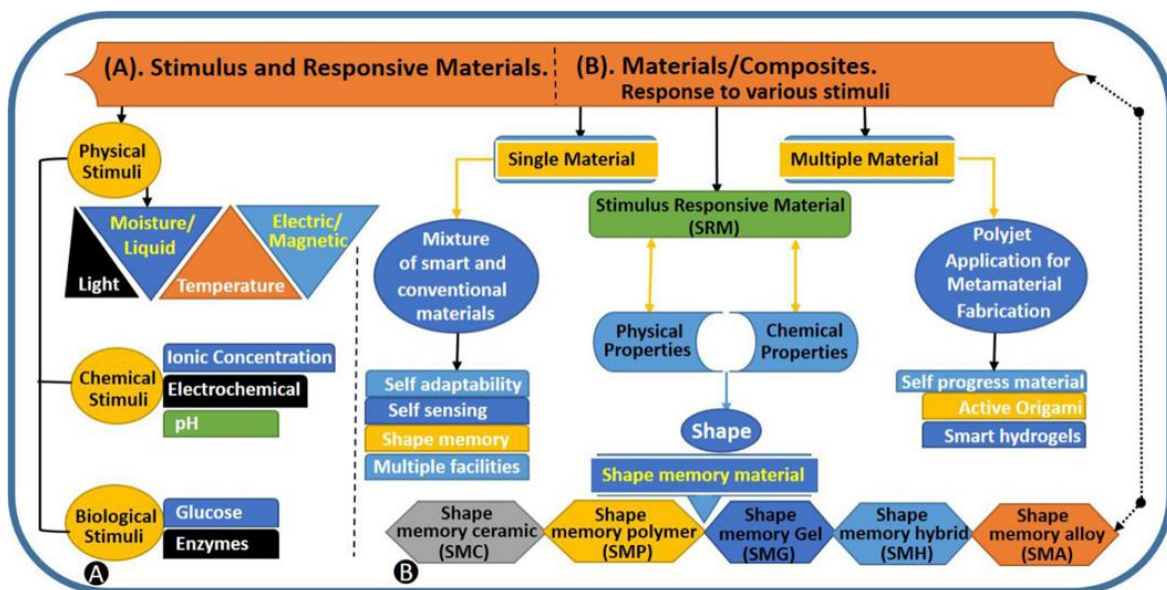


Figura 6.2: rappresentazione schematica del bioprinting 4D basato sulla tecnologia a transizione di forma, per effetto degli stimoli esterni. Sono quindi indicati materiali, stimoli e proprietà desiderate [63].

6.2 Tecnologie basate su trasformazioni funzionali

Diversamente dalle tecnologie basate sulle variazioni di forma, quelle incentrate sulle trasformazioni funzionali sono mirate a favorire la creazione di un ambiente altamente biomimetico. Ad oggi non esiste una loro vera e propria applicazione nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo; seppure alcuni studiosi siano riusciti a rimodellare una microstruttura biologica (in vitro) attraverso l'uso di nanoparticelle metalliche e stimoli magnetici. Dunque, un'eventuale applicazione di questo concetto consentirebbe la realizzazione di strutture anisotrope e dotate di migliori proprietà meccaniche lungo una specifica direzione, esattamente come nel tessuto osseo naturale [56].

6.3 Esempio applicativo

Da un punto di vista applicativo, alcuni composti hanno già palesato proprietà interessanti, degne appunto di maggiori approfondimenti. Fra questi rientra sicuramente il composto PNIPAm/CS/acido ialuronico che, sintetizzato sotto forma di idrogel iniettabile, permette di riempire i difetti ossei (di piccole dimensioni) apportando miglioramenti significativi allo stato patologico considerato. Inoltre, la stabilità strutturale di tale materiale può essere ulteriormente ottimizzata mediante l'inclusione di particelle di β -TCP, nano-HA, e BG. Tuttavia, allo stato attuale, questa tecnologia non è adatta al trattamento dei CSD, ma solamente alla riparazione di piccoli difetti ossei [56].

In Figura 6.3 sono rappresentate le possibili modalità di applicazione del bioprinting 4D, con riferimento ad ogni caso trattato in precedenza.

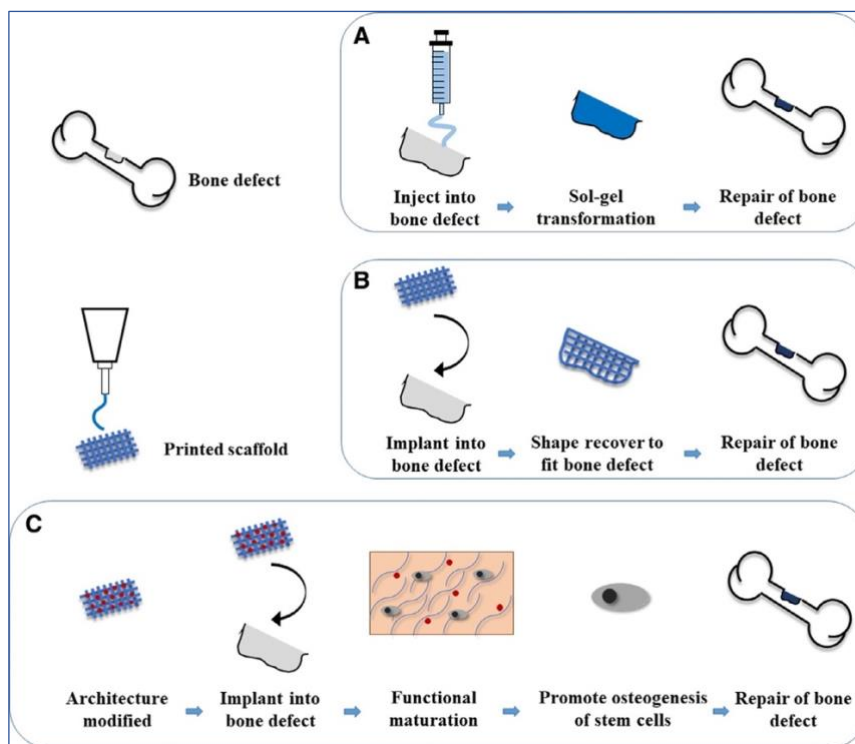


Figura 6.3: rappresentazione sintetica delle possibili modalità di applicazione del bioprinting 4D nell'ingegnerizzazione del tessuto osseo. Le possibili modalità ipotizzate sono: (A) iniezione di un idrogel termosensibile all'interno del difetto osseo (con temperatura di solidificazione pari a quella corporea); (B) inserimento di uno scaffold in grado di mutare forma, adattarsi al sito di innesto e riempire ogni spazio vuoto; (C) inserimento di uno scaffold in grado di evolversi da un punto di vista funzionale e modificare la sua micro-architettura, così da promuovere il processo di osteogenesi [56].

6.4 Limiti

Tuttavia, nonostante i molti lati positivi, il bioprinting 4D racchiude ogni lato negativo del bioprinting 3D, aggiungendone addirittura altri. È quindi innegabile la necessità di sviluppare ulteriori materiali che siano:

- biocompatibili, non tossici, stampabili con le attuali tecnologie e a basso costo;
- reattivi a più stimoli differenti contemporaneamente;

- capaci di sopportare numerosi cicli di transizione di forma senza andare incontro a deformazioni e/o rottura;
- adeguati a realizzare forme complesse (e non solo folding/unfolding) tali da migliorare la biomimetività dello scaffold;
- dotati di alta efficienza e di un meccanismo di transizione veloce (al massimo pochi secondi);
- attivabili con stimoli non tossici e compatibili da un punto di vista fisiologico [56], [64].

Conclusioni

Nonostante il tessuto osseo abbia ottime capacità rigenerative e riparative, il ricorso a materiali esogeni è essenziale nella buona riuscita del processo di guarigione dei difetti ossei di dimensione critica.

A tal proposito, rispetto alle tecnologie tradizionali (trapianto, tecnica di Masquelet e tecnica di Ilizarov), l'introduzione dell'additive manufacturing nella medicina ha aperto prospettive inimmaginabili fino a poco tempo fa. In particolare, la sua adozione consente di beneficiare di un esito finale di ottima qualità (da un punto di vista funzionale ed estetico), di una più accurata pianificazione dell'intervento chirurgico, nonché di minori complicazioni in sede operatoria e post-operatoria. Tuttavia, allo stato attuale devono ancora essere risolte innumerevoli sfide, fra loro interdipendenti e legate sia alla componente software, sia a quella hardware.

Per quanto riguarda i casi di CSD, il vantaggio offerto dall'impiego di queste tecniche è soggettivo e può variare da paziente a paziente, e dipende dall'esperienza del chirurgo. A ciò, inoltre, si somma anche l'aspetto economico, che spesso viene considerato un fattore positivo solamente dal punto di vista del costo del singolo prodotto realizzato; ma non viene accuratamente inserito all'interno di una visione d'insieme, comprensiva di costi diretti e indiretti. A questo riguardo, se si considerano i costi (indicativi) di:

- personale qualificato (variabile a seconda della regione; 45 USD all'ora per un impiegato informatico, 15.24 EUR per un chirurgo junior (Belgio)) [21];
- eventuale formazione del personale non sufficientemente qualificato (da 225 USD per una sessione di 3 ore, fino a 3000 EUR per un corso di due giorni) [21];
- strumentazione diagnostica adeguatamente accurata (non definito);
- stampanti 3D (> 600 USD, ma può andare anche oltre 250 000 USD) [21];
- manutenzione e assicurazione della stampante (rispettivamente 200 USD e 350 USD annui) [21];
- licenze software (da 699 USD per una licenza annuale di Osirix, fino a 21 000 USD per una licenza annuale completa di MIMICS) [21];
- materiali (PEEK: 25 – 70 €/kg; filamenti di PLA: 11.90 – 60 USD/kg; alginato: 100 GBP/kg; acido ialuronico: 57 000 GBP/kg; fotopolimeri: 175 USD/kg, 200 USD/cartuccia, 280 EUR/L) [21], [57], [58];
- trattamenti post-printing (non definito);
- costo ospedaliero (non definito);

è evidente come l'impiego dell'AM, da parte di una struttura sanitaria, sia effettivamente vantaggioso solo se il numero di pazienti trattati è almeno sufficiente a coprire i costi indiretti [21], [40], [57].

Nonostante ciò, l'impiego della stampa 3D in ambito clinico ha riscosso un notevole successo, sia da parte dei chirurghi, ora in grado di pianificare interventi e gestire quasi autonomamente le peculiarità dei singoli soggetti, sia da parte dei pazienti, che possono godere di una migliore aspettativa e qualità di vita. Nello specifico, si rivolgono particolari attenzioni al POC-3DP dato che tale approccio permette di abbattere il costo complessivo (eliminando i costi associati a trasporti, comunicazione, ecc.) e di ridurre anche i tempi morti fra le fasi di progettazione, realizzazione e innesto delle protesi. Chiaramente, la transizione da medicina sostitutiva a rigenerativa non è semplice, e pertanto quest'ultima modalità non sarà disponibile nel breve termine, ma rappresenta una suggestiva area di sviluppo. In particolare, il 3D bioprinting dimostra di avere tutte le qualità per diventare la tecnologia di punta in questo settore, nonostante la complessità dei problemi legati ai limiti di scalabilità, stampa multimateriale, perfusione e maturazione dei tessuti neoformati. Da ciò inevitabilmente segue che il 4D bioprinting, seppure ancora più interessante, risulta essere una prospettiva più remota e difficile da sviluppare oggi come oggi, dati i problemi di realizzare materiali reattivi a stimoli multipli, altamente efficienti e compatibili con le normali condizioni fisiologiche.

In generale, comunque, data la necessità di creare lo specifico modello CAD prima della stampa e dell'intervento, è impossibile adoperare tali tecnologie in medicina d'urgenza, ma piuttosto le si prediligono per il trattamento di patologie croniche (come tumori e osteomieliti) che non degenerano drasticamente nell'arco di poche ore o giorni (diversamente dai casi di fratture complesse dovute a traumi).

In conclusione, quindi, per ottenere grandi passi avanti nel settore dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo, e passare dal concetto di medicina sostitutiva a quello di medicina rigenerativa, è necessario uno sforzo congiunto interdisciplinare. Questa ideale collaborazione fra ricercatori e centri di ricerca avrebbe quindi il compito di migliorare gli aspetti legati a:

- accuratezza dei software impiegati nella scansione e ricostruzione del modello virtuale;
- sviluppo di software di progettazione multi-scala in grado di realizzare geometrie cave, multicellulari e multifase, tenendo in considerazione il rischio di possibili collassi strutturali;
- controllo automatico del processo di stampa e della qualità del bioink in fase di deposizione;
- identificazione della corretta composizione e proporzione dei materiali costituenti i bioink (dato che un risultato soddisfacente può essere raggiunto solo con l'utilizzo di materiali compositi e non con soli materiali puri);
- sviluppo delle tecniche di stampa e ricerca di materiali innovativi;
- perfusione, innervazione e scalabilità dello scaffold;
- sviluppo di software di simulazione multi-scala e multifase, finalizzati a valutare le proprietà dello scaffold allo stato iniziale e in seguito ad una sua maturazione.

Ovviamente, ad oggi, è impossibile risolvere tutti questi problemi in autonomia, ma sicuramente l'aiuto fornito da una efficace collaborazione tra professionisti di aree disciplinari diverse e complementari agevolerebbe sensibilmente questo processo.

Bibliografia

- [1] The White House and Office of the Press Secretary, 'FACT SHEET: President Obama's Precision Medicine Initiative', Jan. 30, 2015. <https://obamawhitehouse.archives.gov/the-press-office/2015/01/30/fact-sheet-president-obama-s-precision-medicine-initiative> (accessed Apr. 12, 2023).
- [2] C. K. Mayfield, M. Ayad, E. Lechtholz-Zey, Y. Chen, and J. R. Lieberman, '3D-Printing for Critical Sized Bone Defects: Current Concepts and Future Directions', *Bioengineering*, vol. 9, no. 11, p. 680, Nov. 2022, doi: 10.3390/bioengineering9110680.
- [3] D. N. Bracey *et al.*, 'Bone xenotransplantation: A review of the history, orthopedic clinical literature, and a single-center case series', *Xenotransplantation*, vol. 27, no. 5, Sep. 2020, doi: 10.1111/xen.12600.
- [4] E. F. Morgan, G. U. Unnikrisnan, and A. I. Hussein, 'Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States', *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 20, no. 1, pp. 119–143, Jun. 2018, doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121139.
- [5] C. Di Bello and A. Bagnò, *Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, 2. ed. Bologna: Pàtron, 2016.
- [6] S. Standring, N. Ananad, H. Gray, and H. Gray, Eds., *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*, 41. ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier, 2016.
- [7] P. Casini and M. Vasta, *Scienza delle costruzioni*, 4. ed. Torino: CittaStudi, 2020.
- [8] S. Li *et al.*, 'Atlas of Human Skeleton Hardness Obtained Using the Micro-indentation Technique', *Orthop Surg*, vol. 13, no. 4, pp. 1417–1422, Jun. 2021, doi: 10.1111/os.12841.
- [9] Y. C. Fung, *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. Place of publication not identified: Springer Nature : Springer, 2013.
- [10] University of Cambridge, 'Mechanical properties of bone'. https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/bone_mechanical.php (accessed Apr. 29, 2023).
- [11] D. Wu, P. Isaksson, S. J. Ferguson, and C. Persson, 'Young's modulus of trabecular bone at the tissue level: A review', *Acta Biomaterialia*, vol. 78, pp. 1–12, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.001.
- [12] Z. Yazdanpanah, J. D. Johnston, D. M. L. Cooper, and X. Chen, '3D Bioprinted Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State-Of-The-Art and Emerging Technologies', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022.
- [13] H. Bezstarosti *et al.*, 'Management of critical-sized bone defects in the treatment of fracture-related infection: a systematic review and pooled analysis', *Arch Orthop Trauma Surg*, vol. 141, no. 7, pp. 1215–1230, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00402-020-03525-0.
- [14] E. Roddy, M. R. DeBaun, A. Daoud-Gray, Y. P. Yang, and M. J. Gardner, 'Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives', *Eur J Orthop Surg Traumatol*, vol. 28, no. 3, pp. 351–362, Apr. 2018, doi: 10.1007/s00590-017-2063-0.
- [15] P. Andrzejowski and P. V. Giannoudis, 'The "diamond concept" for long bone non-union management', *J Orthop Traumatol*, vol. 20, no. 1, p. 21, Dec. 2019, doi: 10.1186/s10195-019-0528-0.
- [16] J. D. Stroncek and W. M. Reichert, 'Overview of Wound Healing in Different Tissue Types', in *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment*, W. M. Reichert, Ed., in *Frontiers in Neuroengineering*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2008. Accessed: May 10, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3938/>
- [17] J. R. Sheen and V. V. Garla, 'Fracture Healing Overview', in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Accessed: May 10, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>
- [18] A. H. Schmidt, 'Autologous bone graft: Is it still the gold standard?', *Injury*, vol. 52, pp. S18–S22, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.injury.2021.01.043.
- [19] I. Domic-Cule *et al.*, 'Biological aspects of segmental bone defects management',

- International Orthopaedics (SICOT)*, vol. 39, no. 5, pp. 1005–1011, May 2015, doi: 10.1007/s00264-015-2728-4.
- [20] T. T. Roberts and A. J. Rosenbaum, ‘Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing’, *Organogenesis*, vol. 8, no. 4, pp. 114–124, Oct. 2012, doi: 10.4161/org.23306.
- [21] D. Ostaş *et al.*, ‘Point-of-Care Virtual Surgical Planning and 3D Printing in Oral and Cranio-Maxillofacial Surgery: A Narrative Review’, *JCM*, vol. 11, no. 22, p. 6625, Nov. 2022, doi: 10.3390/jcm11226625.
- [22] C. Chen, B. Huang, Y. Liu, F. Liu, and I.-S. Lee, ‘Functional engineering strategies of 3D printed implants for hard tissue replacement’, *Regenerative Biomaterials*, vol. 10, p. rbac094, Jan. 2023, doi: 10.1093/rb/rbac094.
- [23] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, and D.-H. Kim, ‘3D bioprinting for engineering complex tissues’, *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 4, pp. 422–434, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.011.
- [24] L. L. Hench, J. R. Jones, and Institute of Materials, Minerals, and Mining, Eds., *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. in Woodhead Publishing in materials. Boca Raton : Cambridge: CRC Press ; Woodhead, 2005.
- [25] C. Pakhomova, D. Popov, E. Maltsev, I. Akhatov, and A. Pasko, ‘Software for Bioprinting’, *Int J Bioprint*, vol. 6, no. 3, Jun. 2020, doi: 10.18063/ijb.v6i3.279.
- [26] I. Ozbolat and H. Gudapati, ‘A review on design for bioprinting’, *Bioprinting*, vol. 3–4, pp. 1–14, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.bprint.2016.11.001.
- [27] M. Van Eijnatten, R. Van Dijk, J. Dobbe, G. Streekstra, J. Koivisto, and J. Wolff, ‘CT image segmentation methods for bone used in medical additive manufacturing’, *Medical Engineering & Physics*, vol. 51, pp. 6–16, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.medengphy.2017.10.008.
- [28] M. Maroulakos, G. Kamperos, L. Tayebi, D. Halazonetis, and Y. Ren, ‘Applications of 3D printing on craniofacial bone repair: A systematic review’, *Journal of Dentistry*, vol. 80, pp. 1–14, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jdent.2018.11.004.
- [29] F. Rengier *et al.*, ‘3D printing based on imaging data: review of medical applications’, *Int J CARS*, vol. 5, no. 4, pp. 335–341, Jul. 2010, doi: 10.1007/s11548-010-0476-x.
- [30] C. Belvedere *et al.*, ‘Comparison of Bone Segmentation Software over Different Anatomical Parts’, *Applied Sciences*, vol. 12, no. 12, p. 6097, Jun. 2022, doi: 10.3390/app12126097.
- [31] Á. Serrano-Aroca *et al.*, ‘Scaffolds in the microbial resistant era: Fabrication, materials, properties and tissue engineering applications’, *Materials Today Bio*, vol. 16, p. 100412, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100412.
- [32] A. T. Khalaf *et al.*, ‘Bone Tissue Engineering through 3D Bioprinting of Bioceramic Scaffolds: A Review and Update’, *Life*, vol. 12, no. 6, p. 903, Jun. 2022, doi: 10.3390/life12060903.
- [33] M. Mirkhalaf, Y. Men, R. Wang, Y. No, and H. Zreiqat, ‘Personalized 3D printed bone scaffolds: A review’, *Acta Biomaterialia*, vol. 156, pp. 110–124, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.actbio.2022.04.014.
- [34] W. Tanveer, A. Ridwan-Pramana, P. Molinero-Mourelle, and T. Forouzanfar, ‘Systematic Review of Clinical Applications of CAD/CAM Technology for Craniofacial Implants Placement and Manufacturing of Orbital Prostheses’, *IJERPH*, vol. 18, no. 21, p. 11349, Oct. 2021, doi: 10.3390/ijerph182111349.
- [35] Z. Kresanova and J. Kostolny, ‘□Comparison of Software for Medical Segmentation’, no. 2.
- [36] M. Larobina and L. Murino, ‘Medical Image File Formats’, *J Digit Imaging*, vol. 27, no. 2, pp. 200–206, Apr. 2014, doi: 10.1007/s10278-013-9657-9.
- [37] S. C. Nyirjesy *et al.*, ‘The role of computer aided design/computer assisted manufacturing (CAD/CAM) and 3- dimensional printing in head and neck oncologic surgery: A review and future directions’, *Oral Oncology*, vol. 132, p. 105976, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.105976.
- [38] T. Genova, I. Roato, M. Carossa, C. Motta, D. Cavagnetto, and F. Mussano, ‘Advances on

- Bone Substitutes through 3D Bioprinting’, *IJMS*, vol. 21, no. 19, p. 7012, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21197012.
- [39] S. Tharakan, S. Khondkar, and A. Ilyas, ‘Bioprinting of Stem Cells in Multimaterial Scaffolds and Their Applications in Bone Tissue Engineering’, *Sensors*, vol. 21, no. 22, p. 7477, Nov. 2021, doi: 10.3390/s21227477.
- [40] M. Lee, R. Rizzo, F. Surman, and M. Zenobi-Wong, ‘Guiding Lights: Tissue Bioprinting Using Photoactivated Materials’, *Chem. Rev.*, vol. 120, no. 19, pp. 10950–11027, Oct. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00077.
- [41] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, and D. Hui, ‘3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective’, *Composites Part B: Engineering*, vol. 110, pp. 442–458, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.compositesb.2016.11.034.
- [42] F. Xing, Z. Xiang, P. M. Rommens, and U. Ritz, ‘3D Bioprinting for Vascularized Tissue-Engineered Bone Fabrication’, *Materials*, vol. 13, no. 10, p. 2278, May 2020, doi: 10.3390/ma13102278.
- [43] A. A. Armstrong, A. Pfeil, A. G. Alleyne, and A. J. Wagoner Johnson, ‘Process monitoring and control strategies in extrusion-based bioprinting to fabricate spatially graded structures’, *Bioprinting*, vol. 21, p. e00126, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00126.
- [44] Loughborough University, ‘About Additive Manufacturing - VAT Photopolymerisation’. <https://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/vatphotopolymerisation/> (accessed Aug. 10, 2023).
- [45] H. Ravanbakhsh, V. Karamzadeh, G. Bao, L. Mongeau, D. Juncker, and Y. S. Zhang, ‘Emerging Technologies in Multi-Material Bioprinting’, *Advanced Materials*, vol. 33, no. 49, p. 2104730, Dec. 2021, doi: 10.1002/adma.202104730.
- [46] Z. M. Jessop, ‘3D bioprinting for reconstructive surgery: Principles, applications and challenges’.
- [47] L. de Silva, P. N. Bernal, A. Rosenberg, J. Malda, R. Levato, and D. Gawlitta, ‘Biofabricating the vascular tree in engineered bone tissue☆’, *Acta Biomaterialia*, 2023.
- [48] R. Dwivedi and D. Mehrotra, ‘3D bioprinting and craniofacial regeneration’, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 10, no. 4, pp. 650–659, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.jobcr.2020.08.011.
- [49] National Center for Biotechnology Information, ‘Periodic table of elements’. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/periodic-table/#view=table> (accessed Aug. 22, 2023).
- [50] LimaCorporate S.p.A., ‘Trabecular Titanium - Lima Impact - A Tool dedicated to Support Evidence-Based Medical Practice’. <https://limacorporate.com/en/homepage.html> (accessed Aug. 22, 2023).
- [51] LimaCorporate S.p.A., ‘ProMade - Lima Implant S.l.u.’ <https://es.limacorporate.com/en/product-detail/231/promade.html> (accessed Aug. 27, 2023).
- [52] O. Riester, M. Borgolte, R. Csuk, and H.-P. Deigner, ‘Challenges in Bone Tissue Regeneration: Stem Cell Therapy, Biofunctionality and Antimicrobial Properties of Novel Materials and Its Evolution’, *IJMS*, vol. 22, no. 1, p. 192, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms22010192.
- [53] O. Tao *et al.*, ‘The Applications of 3D Printing for Craniofacial Tissue Engineering’, *Micromachines*, vol. 10, no. 7, p. 480, Jul. 2019, doi: 10.3390/mi10070480.
- [54] N. Li, R. Guo, and Z. J. Zhang, ‘Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration’, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 630488, Feb. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.630488.
- [55] M. Hospodiuk, M. Dey, D. Sosnoski, and I. T. Ozbolat, ‘The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials’, *Biotechnology Advances*, vol. 35, no. 2, pp. 217–239, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.006.
- [56] Z. Wan, P. Zhang, Y. Liu, L. Lv, and Y. Zhou, ‘Four-dimensional bioprinting: Current developments and applications in bone tissue engineering’, *Acta Biomaterialia*, vol. 101, pp. 26–42, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.10.038.
- [57] S. P. Tarassoli, Z. M. Jessop, T. Jovic, K. Hawkins, and I. S. Whitaker, ‘Candidate Bioinks

- for Extrusion 3D Bioprinting—A Systematic Review of the Literature’, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 616753, Oct. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.616753.
- [58] A. K. Van der Vegt and L. E. Govaert, *Polymeren*, 5th ed. VSSD, 2005.
- [59] American Chemical Society, ‘CAS Common Chemistry’. <https://commonchemistry.cas.org> (accessed Aug. 28, 2023).
- [60] I. L. Tsiklin, A. V. Shabunin, A. V. Kolsanov, and L. T. Volova, ‘In Vivo Bone Tissue Engineering Strategies: Advances and Prospects’, *Polymers*, vol. 14, no. 15, p. 3222, Aug. 2022, doi: 10.3390/polym14153222.
- [61] X. Wen, S. Gao, J. Feng, S. Li, R. Gao, and G. Zhang, ‘Chest-wall reconstruction with a customized titanium-alloy prosthesis fabricated by 3D printing and rapid prototyping’, *J Cardiothorac Surg*, vol. 13, no. 1, p. 4, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13019-017-0692-3.
- [62] N. Li, R. Guo, and Z. J. Zhang, ‘Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration’, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 630488, Feb. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.630488.
- [63] M. I. Farid, W. Wu, X. Liu, and P. Wang, ‘Additive manufacturing landscape and materials perspective in 4D printing’, *Int J Adv Manuf Technol*, vol. 115, no. 9–10, pp. 2973–2988, Aug. 2021, doi: 10.1007/s00170-021-07233-w.
- [64] X. Zhang *et al.*, ‘Four-Dimensional Printing and Shape Memory Materials in Bone Tissue Engineering’, *IJMS*, vol. 24, no. 1, p. 814, Jan. 2023, doi: 10.3390/ijms24010814.

RINGRAZIAMENTI

Al Professor Andrea Bagno che è riuscito sin dalla prima lezione a trasmettermi la sua passione per gli argomenti trattati e che mi ha poi seguito con dedizione nella stesura della tesi. È stato una guida di inestimabile valore ed è stato un indubbio privilegio aver avuto l'occasione di scrivere una tesi arricchita dai suoi preziosi consigli.

Agli amici di sempre e a quelli più cari dell'università, perché tra banchi di scuola, grigliate, capodanni, mercoledì sera e partite a RisiKo!, siete diventati parte integrante dei momenti più belli e un appoggio fondamentale nei momenti più bui. Sono fortunato ad avervi tuttora al mio fianco e vi sarò sempre grato per avermi supportato e sopportato in ogni occasione.

Ai coinquilini di Via Turazza, perché grazie a voi ho imparato a sopravvivere fuori casa, cercando addirittura di combinare la sana cucina e l'ottimizzazione del tempo. Conserverò ricordi stupendi dei nostri scherzi giornalieri e delle nostre serate, e vi auguro che i futuri coinquilini siano ordinati anche solo la metà di me!

Alla mia famiglia, perché siete sempre stati i miei primi sostenitori: senza di voi raggiungere questo traguardo non sarebbe stato possibile; e, proprio per questo, il merito principale non è mio, ma appartiene a tutti noi. Un ringraziamento particolare al papà e alla mamma per il costante aiuto, per gli infiniti suggerimenti e per la disponibilità ad accogliermi a casa ogni fine settimana (quando invece speravano di essersi liberati di me). Mio fratello invece, merita una menzione speciale, in quanto amico, coinquilino e parte di me, da sempre. Grazie a te tutto diventa più facile e leggero, e ogni momento trascorso con te vale più di ogni cosa.

Pertanto, *a tutti voi*, rivolgo i migliori auguri per il futuro e i miei più sinceri ringraziamenti per ogni occasione condivisa insieme.