



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



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

**“Biomateriali a base di idrogel e loro applicazioni
nella stampa 3D di organi solidi”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Marta Meneghetti

ANNO ACCADEMICO 2022 –2023

Data di laurea 28/09/2023

Indice

Abstract	pagina 5
Introduzione	pagina 7
Capitolo 1: Considerazioni generali nella selezione di un biomateriale	pagina 9
1.1 Tipologie di materiali e classificazioni	pagina 9
1.2 Problematiche nella produzione di scaffold ad uso biomedico	pagina 12
Capitolo 2: Bioprinting per scaffold	pagina 15
2.1 Cos'è la stampa 3D?	pagina 16
2.2 I metodi di stampa	pagina 18
2.3 Gli scaffold: funzione e caratteristiche	pagina 24
Capitolo 3: Idrogel per il bioprinting	pagina 27
3.1 Idrogel e le loro peculiarità	pagina 28
3.2 Idrogel per la realizzazione di scaffold nella rigenerazione tissutale	pagina 29
Conclusioni e prospettive future	pagina 37
Bibliografia	pagina 39

Abstract

La stampa 3D di organi solidi è emersa come una promettente soluzione per la crescente domanda di trapianti di tessuti o organi. Tuttavia, la realizzazione di tessuti e organi funzionali richiede l'utilizzo di materiali in grado di riprodurre la complessa struttura e funzionalità, al contempo garantendo la massima biocompatibilità. Alcuni dei materiali più promettenti per la stampa 3D sono gli idrogel, che si distinguono per le loro proprietà uniche e simili a quelle dei tessuti biologici.

A partire da una revisione approfondita della letteratura scientifica, questa tesi si propone di presentare una panoramica dei biomateriali a base di idrogel e delle loro applicazioni nel bioprinting. Saranno illustrate le proprietà degli idrogel che li rendono adatti all'impiego nella stampa 3D come scaffold. Verranno anche considerate le sfide associate all'utilizzo di questi materiali, come la necessità di migliorare la resistenza meccanica e la vascolarizzazione dei tessuti stampati. Inoltre, saranno presentate le diverse strategie di bioprinting e i meccanismi di funzionamento della stampa.

Lo studio e la ricerca applicata sugli idrogel stanno aprendo sempre maggiori prospettive nella medicina rigenerativa e, più in generale, nel campo dell'ingegneria tissutale. Fondamentale, oggi, è che la ricerca sia interdisciplinare: ad esempio, la *click chemistry* ha recentemente contribuito a ideare un tipo di nuovo idrogel particolarmente promettente.

Introduzione

La stampa 3D degli organi è una delle più promettenti frontiere della medicina rigenerativa. Grazie all'evoluzione delle tecnologie dei biomateriali, ed in particolare, di quelli in forma di idrogel, si è arrivati alla possibilità di creare strutture tridimensionali complesse e funzionali. Questi materiali polimerici altamente idratati presentano un insieme eccezionale di caratteristiche meccaniche (ad esempio: rigidità, dimensione dei pori e trasmissione degli impulsi elettrici) e biocompatibilità. La combinazione di un elevato contenuto di acqua e della loro composizione chimica conferisce loro proprietà simili a quelle dei tessuti biologici.

La stampa 3D consente la produzione di strutture tridimensionali (scaffold), che permettono la proliferazione cellulare mimando, il più fedelmente possibile, l'architettura dei tessuti biologici. Se efficacemente colonizzati dalle specifiche cellule, questi scaffold possono essere studiati o utilizzati per diverse applicazioni in ambito biomedico. Questa tecnica risulta particolarmente interessante perché consente una personalizzazione delle strutture e, quindi, permette di adattare lo sviluppo e la crescita degli organi ingegnerizzati alle specifiche esigenze dei pazienti, riducendo il rischio di rigetto e migliorando l'integrazione con il tessuto ospite. È possibile così raggiungere un livello di precisione e riproducibilità che permette di creare strutture con un'architettura biomimetica, promuovendo una migliore funzionalità e interazione con il sistema biologico ospite.

Si tratta di una soluzione della medicina rigenerativa che apre nuove prospettive per il trattamento di patologie e lesioni che richiedono la sostituzione o il ripristino degli organi. La capacità di creare organi ingegnerizzati personalizzati e funzionali potrebbe rivoluzionare il trattamento di malattie croniche, lesioni e patologie che richiedono la sostituzione o il ripristino degli organi oltre ad avere un possibile utilizzo nella ricerca clinica, dal momento che offre una base per eseguire test con risultati più validi e attendibili rispetto a quelli ottenuti con l'impiego di materiali sintetici. Quindi, l'approccio della stampa 3D con gli idrogel prospetta nuove speranze per migliorare la qualità della vita dei pazienti e apre nuove prospettive per la medicina del futuro.

Grazie alla sua struttura porosa, l'idrogel, permette il trasporto di sostanze nutritive, l'eliminazione dei prodotti di scarto, nonché la diffusione di molecole segnale fondamentali per il corretto sviluppo e funzionamento del tessuto, mentre la sua natura altamente idratata, permette di ricreare un ambiente simile a quello biologico. Anche la sua flessibilità meccanica lo rende un materiale particolarmente adatto alle applicazioni sopra citate. Essa, infatti, può essere appositamente modulata per adattarsi alle esigenze specifiche di diversi tipi di tessuti,

garantendo così una perfetta adattabilità e un'interazione ottimale con le cellule circostanti. Per questi motivi l'idrogel facilita la crescita e sopravvivenza delle cellule all'interno degli scaffold e il suo utilizzo nella stampa 3D degli organi apre nuovi orizzonti per la produzione di organi ingegnerizzati personalizzati.

Tuttavia, sono ancora presenti importanti ostacoli da affrontare per rendere la stampa 3D degli organi utilizzando gli idrogel una realtà clinicamente applicabile. La ricerca continua a concentrarsi sulla selezione dei biomateriali più idonei, sulla progettazione di bioinchiostri con caratteristiche meccaniche e biologiche ottimali, nonché sull'ottimizzazione dei processi di stampa per garantire una fedele riproduzione delle strutture desiderate. Inoltre, la vascolarizzazione dei tessuti stampati e l'integrazione con il sistema vascolare del paziente rappresentano sfide complesse che richiedono ulteriori approfondimenti e sviluppi.

L'obiettivo principale di questa tesi è illustrare i criteri alla base della scelta dei biomateriali e le problematiche legate al loro impiego, oltre ad approfondire le applicazioni specifiche degli idrogel nel contesto della stampa 3D di scaffold per la rigenerazione degli organi.

Capitolo 1. Considerazioni generali nella selezione di un biomateriale

Al fine di compiere una scelta adeguata sul tipo di biomateriali da impiegare nella progettazione di scaffold destinati alla stampa tridimensionale di organi solidi, è di fondamentale importanza considerare le diverse tipologie di materiali disponibili e le relative classificazioni, ponendo particolare enfasi sull'approfondimento delle possibili problematiche legate alla compatibilità e al conseguente impatto sulle proprietà del materiale stesso.

Questo capitolo introduttivo esplorerà l'ampia gamma di materiali disponibili per l'utilizzo in campo biomedico, tra cui polimeri, ceramici e metalli, valutandone le caratteristiche e le potenziali applicazioni. Per offrire una panoramica completa, si accennerà anche alle diverse classificazioni dei biomateriali, sulla base di biodegradabilità, bioattività e compatibilità con il tessuto ospite, fornendo una base solida per la selezione appropriata dei materiali.

Verrà dedicata una particolare attenzione all'analisi delle problematiche legate all'utilizzo di questi materiali in ambito biologico e in che modo gli idrogel siano in grado di limitarle.

1.1 Tipologie di materiali e classificazioni

Nell'ambito della bioingegneria, la scelta dei materiali adeguati è fondamentale. I materiali impiegati, infatti, sono concepiti per interagire con i sistemi biologici e quindi devono essere in grado di operare in intimo contatto con i tessuti viventi, minimizzando eventuali reazioni avverse o di rigetto. Di conseguenza, vengono impiegati i biomateriali, cioè sostanze utilizzate per valutare, dare supporto o costruire strutture in grado di sostituire o trattare un tessuto, organo o funzione del corpo umano. Una definizione più precisa e universalmente accettata di biomateriale è la seguente: "materiali biologici o di sintesi progettati per essere a contatto prolungato con i sistemi biologici, minimizzando le eventuali reazioni avverse dell'organismo" [1].

In particolare, nel contesto dell'ingegneria dei tessuti e della medicina rigenerativa, è di fondamentale importanza utilizzare scaffold, cioè strutture che fungono da supporto per la crescita del tessuto, realizzati con materiali selezionati nel rispetto di requisiti rigorosi, per garantire un adeguato equilibrio tra la loro compatibilità con l'ambiente biologico e le prestazioni meccaniche e fisiche richieste. Nel contesto degli scaffold, alcune caratteristiche risultano fondamentali quali la biocompatibilità, la biodegradabilità e la biorisorbibilità.

La **biocompatibilità** è un requisito primario per prevenire il rigetto e ridurre le reazioni infiammatorie dopo l'impianto e, evitando di indurre la risposta immunitaria, permette i naturali meccanismi di crescita e sviluppo cellulare. Si tratta di un requisito fondamentale, legato alla

necessità di migliorare o ripristinare una funzione biologica senza interferire in modo dannoso con le attività fisiologiche, che condiziona le reali possibilità di utilizzo pratico di un biomateriale.

Un materiale biocompatibile permette l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, consentendo così la rigenerazione e l'integrazione del tessuto nel corpo. Non è sufficiente però valutare la compatibilità di un materiale a livello biologico, ma è necessario anche valutare quale sarà la funzione alla quale esso è destinato. Quindi si tratta di esaminare sia l'idoneità di un materiale a svolgere una funzione in modo opportuno, in termini di efficacia, sia la sua sicurezza nel non evocare reazioni avverse.

La **biodegradabilità** si riferisce alla capacità del materiale di degradarsi gradualmente nel tempo a contatto con l'ambiente biologico. Questo processo consente al tessuto circostante di crescere e sostituire gradualmente lo scaffold, senza la necessità di interventi chirurgici per rimuoverlo.

Indipendentemente dalla loro origine naturale o sintetica, è cruciale che lo scaffold si degradi una volta in contatto con l'ambiente biologico e consenta il progressivo sviluppo del tessuto.

La cinetica di degradazione dei materiali che costituiscono lo scaffold deve essere attentamente controllata e coordinata con la formazione del nuovo tessuto in vivo. Una degradazione troppo rapida ostacolerebbe la formazione di un tessuto funzionalmente completo e meccanicamente resistente, mentre tempi troppo lunghi ritarderebbero la formazione del nuovo tessuto.

La **biorassorbibilità**, infine, è strettamente correlata alla biodegradabilità ed è la capacità del materiale di essere assorbito dal corpo nel corso del tempo. Il materiale biorassorbibile viene gradualmente degradato in sottoprodotti che sono poi metabolizzati ed eliminati dall'organismo senza provocare effetti tossici, mentre il tessuto di nuova formazione si sviluppa e occupa lo spazio precedentemente occupato dallo scaffold. Questo processo permette la completa integrazione del tessuto rigenerato senza lasciare residui nel corpo.

Altre proprietà favorevoli per i materiali impiegati per gli scaffold sono certamente la **biomimesi** (ovvero la capacità di simulare prestazioni del tessuto biologico) e la bioattività (la capacità di evocare interazioni favorevoli con l'ambiente biologico). L'impianto di materiali permette la formazione di legami e interazioni dirette di tipo biochimico con il tessuto biologico che può crescere sulla superficie del materiale stesso. Talvolta, per favorire tale crescita, si innestano nel materiale proteine specifiche del tessuto ospite di modo che si instauri un legame solido dal punto di vista meccanico e fisiologico tra il tessuto naturale e lo scaffold.

Esistono numerosi materiali idonei per la produzione di scaffold nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, che rispettano le caratteristiche cruciali menzionate in precedenza. Considerando la

classificazione tradizionale dei materiali di seguito riportata (Figura 1.1), è possibile identificare diverse opzioni che soddisfano tali requisiti.

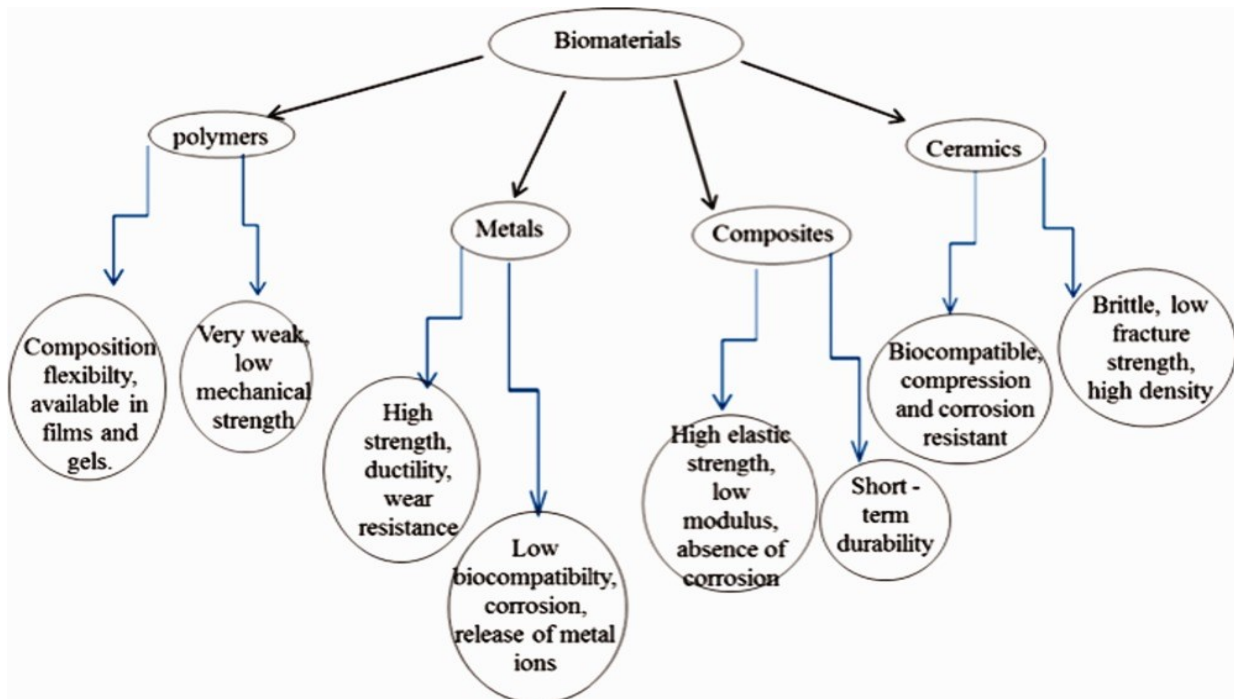


Figura 1.1: Classificazione e principali caratteristiche dei biomateriali (da [2]).

È inoltre possibile una ulteriore classificazione, secondo il seguente schema:

1. Metallici

1.1. Ferrosi

1.2. Non ferrosi

2. Non metallici

2.1. Organici

2.1.1. Polimeri

2.1.1.1. Termoplastici (rispondono ad un aumento di temperatura con una diminuzione di viscosità, proprietà che li rende più duttili)

2.1.1.2. Termo indurenti (una volta sagomati mantengono la loro forma)

2.1.1.3. Elastomeri

2.1.2. Altri non metallici

2.2. Inorganici

2.2.1. Ceramiche

2.2.2. Vetri

2.2.3. Altri inorganici

Una menzione speciale deve essere fatta per i tessuti biologici: essi possono essere considerati come materiali compositi costituiti da un numero variabile di cellule immerse in una sostanza complessa chiamata matrice extracellulare (ECM).

Il loro numero, il tipo e le modalità di associazione, assieme alle caratteristiche chimico-fisiche ed ai rapporti quantitativi tra i diversi componenti della ECM, determinano la struttura, le proprietà e quindi le funzionalità dei diversi tessuti.

Oltre alle caratteristiche già indicate, è importante esaminare adeguatamente altri aspetti specifici quali, ad esempio, la similarità nelle caratteristiche meccaniche con il tessuto ospite e la struttura del biomateriale, che ne definirà il comportamento macroscopico. Difatti, la comprensione dettagliata della struttura dei biomateriali consente di valutarne le proprietà meccaniche, le funzionalità, la porosità, la permeabilità e altre proprietà chiave che influenzano l'efficacia dei biomateriali come scaffold per la stampa 3D di organi solidi.

Tali aspetti saranno presi in esame più dettagliatamente nel capitolo 3 di questo elaborato.

1.2 Problematiche nella produzione di scaffold ad uso biomedico

La biocompatibilità è un requisito primario legato alla necessità di interagire in modo sicuro con i tessuti biologici senza causare reazioni avverse, come rigetto o infiammazione. Bisogna tenere a mente, però, che nessun materiale è completamente inerte in ambiente biologico. Qualsiasi tipo di interazione tra materiali e tessuti biologici, anche quando il tessuto biologico è di origine autologa, provoca una reazione da parte dell'organismo. Il contesto biologico diventa particolarmente ostile nei confronti di materiali eterologhi a causa dell'infiammazione, a causa della reazione del corpo estraneo. La stessa decomposizione dello scaffold può causare un'infiammazione che ostacola la formazione di nuovo tessuto [3].

Il bioprinting, consentendo di impiegare come *bioink* anche sostanze naturali, permette di arginare le problematiche legate proprio alla compatibilità; contemporaneamente, qualora venisse resa possibile una produzione a livello industriale, permetterebbe di limitare la necessità di ricorrere a operazioni chirurgiche per compiere prelievi autologhi o a donazioni. In aggiunta, il bioprinting risulta essere una prospettiva vincente, soprattutto se si considera che permette di creare strutture *solid-scaffold-free* che permettono di aggirare gli aspetti negativi degli scaffold tradizionali, quali il rigetto, la bassa possibilità di customizzazione e la bassa crescita cellulare. Inoltre, la proliferazione delle cellule richiede sia l'utilizzo di uno scaffold, sia l'integrazione di fattori di crescita. Nella creazione di uno scaffold, è necessario integrare un sistema che

rilasci i fattori di crescita in modo graduale e controllato. Se questi diffondono dallo scaffold troppo rapidamente, non verrà garantita la somministrazione per un tempo sufficiente allo sviluppo del tessuto, influenzando negativamente sulla vitalità e funzionalità delle cellule [4].

Quando si parla di stampa per organi ingegnerizzati, ci si pone come obiettivo la creazione di un sistema estremamente complesso. È molto difficile, utilizzando metodi convenzionali, riuscire a costruire tessuti costituiti da regioni a diverse densità cellulari che riproducano la complessità di una struttura multi-tessutale, quale può essere un organo reale. Ciò è permesso dall'utilizzo degli idrogel che, per la loro natura chimico-fisica, consentono anche la trasmissione degli stimoli in maniera simile a quanto avviene nel tessuto naturale, aspetto fondamentale di questo nuovo approccio. Per questi motivi gli idrogel sono considerati uno dei materiali più promettenti per la medicina rigenerativa [5]. Nella produzione di un tessuto (o di un organo), mediante la stampa 3D, il primo passo consiste nel trovare un supporto che permetta la differenziazione precisa delle cellule. Si è scoperto, infatti, che l'elasticità del substrato è un regolatore sorprendentemente fine della differenziazione cellulare; lo scaffold, quindi, dovrà avere modulo elastico volto a simulare le condizioni fisiologiche o patologiche del tessuto che si vuole produrre. In Figura 1.2, è presentata una tabella [6] che illustra quanto diverso possa essere il modulo di elasticità di diversi tessuti umani. La riproducibilità del modulo elastico è quindi particolarmente importante non solo per l'impianto medico, ma anche per la produzione di tessuti ingegnerizzati da utilizzarsi nello studio e nella ricerca medica. Lo sviluppo di modelli tessutali in vitro, che siano chimicamente, fisicamente e biologicamente simili ai tessuti umani sia sani che patologici, offre numerosi vantaggi, come ad esempio la possibilità di testare farmaci, vaccini e terapie innovative [7].

Tissue	Elasticity, E (kPa)	Definition of nomenclature
Embryonic stem cells	~0.2-0.3 Davidson et al. (1999)	E_{ESC} (E of the ECM of stem cells), 'compliant' or 'soft'
Endoderm	~0.1-0.3 Krieg et al. (2008), Rozario et al. (2009)	E_{ENDO} (E of the gastrulating endoderm)
Mesoderm	~0.5-1 Krieg et al. (2008)	E_{MESO} (E of the gastrulating mesoderm)
Nerve	~0.5-1 Flanagan et al. (2002)	E_N (E of nerve ECM), being compliant
Liver (hepatocytes)	~1.5 versus 4.5 Georges et al. (2007)	E_H (E of hepatocyte ECM); normal versus fibrotic
Smooth muscle	~5-9 Engler et al. (2004b)	E_{SM} (E of smooth muscle ECM), being 'semi-compliant'
Skeletal muscle	~8-17 Berry et al. (2006), Collinsworth et al. (2002), Engler et al. (2006)	E_M (E of skeletal muscle ECM), being 'semi-compliant'
Demineralize bone	> 30 Engler et al. (2006)	E_B (E of bone ECM), being 'rigid' or 'stiff'

Figura 1.2: Modulo elastico di alcuni tessuti misurato con microscopio a forza atomica.

Nonostante i vantaggi, l'uso dei tradizionali scaffold nella stampa 3D presenta alcune limitazioni [3]: risulta difficile depositare correttamente e precisamente le cellule nella struttura porosa dello scaffold, soprattutto senza l'uso di stampanti specificamente progettate per la tecnica del bioprinting. Infatti, nelle stampanti standard, l'applicazione di eccessiva pressione

per espellere le gocce, le variazioni di temperatura o l'uso di ugelli troppo piccoli potrebbero danneggiare o causare la morte delle cellule che invece devono preservare proprietà e vitalità, poiché l'obiettivo è la creazione di tessuti. Inoltre, l'aggregazione tra le cellule e il bioink possono occludere gli ugelli della cartuccia non permettendo un'adeguata precisione e continuità di stampa, provocando conseguentemente una ridotta qualità del tessuto [7].

In aggiunta a quanto detto fino a qui, il problema più importante da prendere in esame per l'ingegneria tissutale è certamente il sostentamento dei neotessuti. Infatti, non appena il tessuto supera spessori di 150-200 μm , si pone la necessità di vascolarizzarlo opportunamente. La carenza di nutrienti e ossigeno blocca la crescita del tessuto causando la morte delle cellule. Risulta necessario, quindi, accompagnare alla crescita del tessuto anche un sistema completo di capillari e vasi in grado di perfondere il neo-tessuto. Da questo punto di vista sono stati sviluppati degli approcci che prevedono la creazione di scaffold che presentano dei canali per il trasporto e la diffusione delle sostanze nutritive. Sarà necessario però che questi canali si avvicinino sempre di più, per proprietà meccaniche e caratteristiche chimico-fisiche a dei veri e propri vasi per permettere uno sviluppo completo e funzionale del futuro organo [8].

Un altro ostacolo che ritarda e limita l'applicazione medica della produzione di tessuti o organi mediante la stampa 3D è la necessità di impiegare dei bioreattori per favorire la maturazione e la crescita delle cellule che dovranno assemblarsi a formare il futuro tessuto dallo scaffold. Infatti, affinché gli iniziali aggregati possano svilupparsi in tessuti completamente funzionali con specifiche proprietà meccaniche e biologiche, è necessario un periodo di maturazione in un mezzo di coltura liquido. Questo rallenta notevolmente i tempi di produzione, rendendo l'applicazione su scala industriale impraticabile e generando un aumento dei costi associati.

Pertanto, un nuovo approccio che non dipenda dall'utilizzo degli scaffold tradizionali sembra essere l'unica soluzione per superare queste limitazioni e consentire al *tissue engineering* di avere successo su larga scala [3].

Capitolo 2: Bioprinting per scaffold

Vale la pena analizzare le differenze tra la comune stampa 3D e il bioprinting 3D. Entrambi i processi consentono di creare oggetti mediante un approccio "strato per strato" con la principale differenza legata al tipo di materiale utilizzato per la stampa, il cosiddetto *bioink*. Nel caso della normale stampa 3D, si utilizzano materiali polimerici (p. es., alcool polivinilico, acido polilattico, nylon), mentre nel bioprinting 3D si utilizzano bioinchiostri caricati con cellule [9]. La tecnologia del bioprinting 3D, infatti, è stata implementata, tra le varie applicazioni, negli studi di ingegneria tissutale e di medicina rigenerativa per ottenere scaffold polimerici o a base di idrogel capaci di contenere cellule viventi.

La medicina rigenerativa propone un approccio terapeutico che ha l'obiettivo di stimolare i meccanismi auto-rigenerativi del corpo umano, anziché pensare ad una sostituzione della parte lesa: se l'organismo non è in grado di rigenerare da solo un determinato tessuto o riparare un organo, si può pensare di sfruttare i vantaggi dell'ingegneria tissutale. Quest'ultima si concentra sulla produzione di un sostituto di un tessuto specifico o di un intero organo. L'applicazione di questo processo è basata sull'uso di colture cellulari, che vengono collocate su materiali che fungono da supporto (scaffold) opportunamente costruiti per la crescita cellulare e il successivo innesto nell'organismo. Le colture cellulari utilizzate in questo campo sono principalmente cellule staminali, grazie alla loro pluri- o multipotenza e alla capacità di espansione illimitata [10].

Da un punto di vista biologico, la rigenerazione dei tessuti danneggiati richiede la presenza di matrice extracellulare (ECM), cellule e fattori di crescita. Tuttavia, questi elementi devono essere combinati in modo ben coordinato, sia per quanto riguarda lo spazio, sia per quello che concerne il tempo, al fine di stabilire le corrette interazioni adatte affinché le cellule possano proliferare.

I recenti progressi nel bioprinting 3D hanno migliorato notevolmente la capacità di imitare le caratteristiche naturali della ECM, in quanto consentono la deposizione di polimeri, idrogel, fattori di crescita e peptidi in posizioni simili a quelle che i singoli componenti hanno nei tessuti; si tratta di elementi che, tutti insieme, favoriscono la differenziazione cellulare e la formazione del tessuto. Nello specifico, la biostampa con idrogel (HG) ha il grande potenziale di permettere l'inclusione nel *bioink* di tipi cellulari differenti. Ad esempio, questo metodo è stato utilizzato per ottenere vasi sanguigni, cuori, ossa, cartilagine, reni, pelle, nervi e altri tessuti. È da notare che, se le cellule incluse hanno origine autologa, il tessuto risultante è personalizzato; anche

molecole come il DNA possono essere stampate con successo, consentendo la ricerca sullo sviluppo di alcune terapie [11].

Il presente capitolo fornisce un riepilogo di varie tecniche di stampa 3D per la produzione di scaffold, oltre ad una panoramica di materiali utilizzati.

2.1 Cos'è la stampa 3D?

Il bioprinting è un processo che impiega la tecnologia delle comuni stampanti 3D per creare strutture tridimensionali utilizzando un materiale, chiamato *bioink*, contenente (anche) cellule. Il *bioink* viene depositato su uno speciale supporto, chiamato *biopaper*, in strati successivi. Le cellule presenti nel *bioink* hanno la capacità di fondersi tra di loro quando si trovano a contatto, formando una struttura compatta. In sostanza, il bioprinting sfrutta la capacità delle cellule di organizzarsi per creare oggetti tridimensionali (tessuti, organi) purché in presenza di un mezzo che funga da matrice.

Questa tecnologia di stampa non ha particolari restrizioni in termini di forma e di consistenza della struttura voluta. Utilizzando l'elaborazione automatica delle immagini CAD (*Computer Aided Design*) e la fabbricazione assistita al calcolatore CAM (*Computer Aided Manufacturing*), è possibile realizzare complesse strutture tridimensionali partendo da dati e immagini provenienti da indagini mediche, come la risonanza magnetica (MRI), la tomografia assiale computerizzata (TAC) o da oggetti 3D digitalizzati. L'intero processo di produzione di nuovi tessuti si compone di tre fasi principali: la preelaborazione, l'effettiva fase di stampa e la post-elaborazione.

La **preelaborazione** comprende le fasi di acquisizione del maggior numero possibile di informazioni sul tessuto o sull'organo da ricostruire o da creare ex novo. È in questa fase che vengono utilizzati i diversi metodi di computer-imaging. Sulla base delle informazioni raccolte, poi, è possibile creare un modello digitale del tessuto da stampare con il processo di bioprinting 3D. È preferibile che questo modello venga salvato con il formato di file STL (*Standard Tessellation Language*), lo standard migliore per il trasferimento di dati tra software CAD e stampanti 3D. I file STL sono documenti di testo che salvano informazioni per ogni superficie sotto forma di coordinate dei vertici delle sezioni triangolari del modello. La risoluzione di una superficie è, dunque, determinata dal numero di triangoli che la definiscono. Un esempio di come un file STL triangola le superfici è riportato in Figura 2.1. Le coordinate vengono poi interpretate e convertite, attraverso un software di *slicing*, in un file GCODE contenente tutte le informazioni interpretabili dalla stampante 3D. Questo software divide l'oggetto 3D STL in una sequenza di sezioni trasversali orizzontali di altezza stabilita. L'oggetto 3D viene quindi

stampato partendo dalla base e costruito depositando strati consecutivi del materiale desiderato [12].

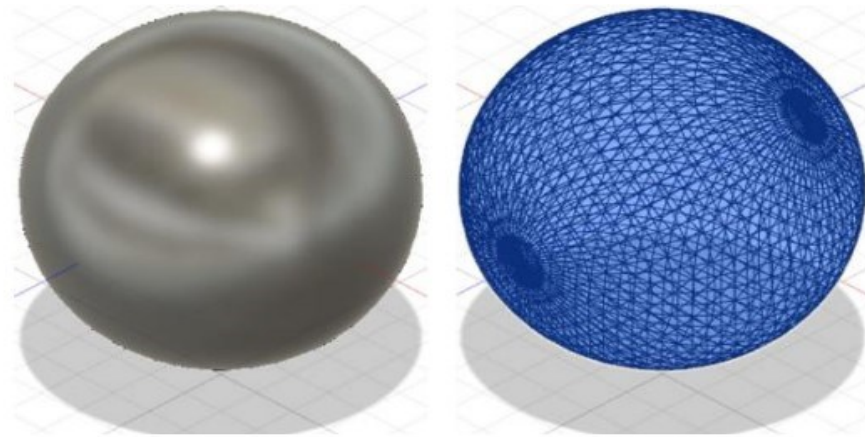


Figura 2.1: Rappresentazione grafica di informazioni in formato STL. L'oggetto a sinistra è stato creato in Fusion 360, un programma CAD. Le informazioni grafiche visualizzate nel file STL sono mostrate a destra. Si noti che la superficie dell'oggetto è triangolata [12].

Anche la **post-elaborazione** è una fase cruciale nella creazione di un biomateriale. Questa fase riguarda il periodo di maturazione del tessuto prodotto affinché sviluppi proprietà e capacità in maniera completa, considerando che le caratteristiche richieste possono essere anche di natura molto diversa. Infatti, oltre alla creazione di sostituti di tessuti viventi, sono stati sviluppati anche modelli per testare farmaci in laboratorio [13] e per medicazioni per ferite [14]. Una volta che le particelle di *bioink* si sono fuse assieme, il costrutto viene trasferito in un bioreattore per la maturazione, acquisendo così le caratteristiche meccaniche e biologiche necessarie per poter essere poi impiantato.

In generale, durante il **processo di stampa** vero e proprio, il sistema di distribuzione rimane fisso, mentre il piano di stampa si muove orizzontalmente grazie alla motorizzazione della piattaforma. Il deposito del *bioink* avviene tramite gli ugelli che, nelle versioni più recenti delle cartucce per il bioprinting, sono più piccoli e più ravvicinati rispetto alle versioni precedenti e garantiscono così un'elevata risoluzione. Talora, le dimensioni ridotte degli ugelli potrebbero danneggiare le cellule durante il processo di stampa, a causa delle maggiori tensioni di taglio (*shear forces*) che si vengono a creare durante l'eiezione. La vitalità cellulare, di solito compresa tra il 40 e l'80%, può raggiungere anche il 97% se si ottimizzano altri parametri di stampa (ad es., temperatura, pressione e velocità di deposizione) [15]. Il controllo di questi parametri è fondamentale per assicurare la massima vitalità cellulare.

L'aspetto, forse, più importante per il successo del bioprinting è la scelta corretta del bioinchiostro. Una preliminare e approfondita indagine reologica del bioinchiostro stesso e un'analisi dei suoi parametri viscoelastici finali (una volta solidificatosi) sono necessarie a

garantire fedeltà nella forma e alta qualità del costruito 3D [16]. Il comportamento viscoelastico, assieme ai valori di tensione di snervamento, strizione al taglio e la tissotropia, rappresenta una delle caratteristiche fondamentali per il processo di bioprinting poiché condiziona la vitalità cellulare [17]. Per essere un buon bioinchiostro, un idrogel deve essere in forma liquida prima della stampa e deve formare il gel solo una volta innescato, trasformandosi in uno scaffold di adeguata consistenza solo quando è stato depositato.

In questo contesto, la tecnologia 3D e i parametri opportunamente scelti per il processo di gelificazione del *bioink* possono permettere di arrivare ad una valida riproduzione della morfologia specifica del tessuto da rigenerare.

Più in generale, per il bioprinting devono essere soddisfatti anche altri requisiti, fondamentali per la creazione di un modello di tessuto appropriato. Come già esposto nel precedente capitolo, questi requisiti includono la biocompatibilità, la biodegradazione e l'assenza di citotossicità: in altre parole, l'idrogel non deve essere dannoso per i tessuti circostanti o per le cellule incorporate [11]. Inoltre, durante tutto il processo bisogna assicurare la sterilità dell'idrogel stampato in 3D.

Un altro vantaggio del bioprinting è quello di permettere la simultanea deposizione di più materiali, usando più cartucce. Ad esempio, può essere iniettato il materiale per lo scaffold di supporto e, contemporaneamente, il *bioink*. Questo approccio è da preferire, dal momento che i più recenti sviluppi del bioprinting mirano a costruire biomateriali già contenenti cellule [18]. In sintesi, la creazione di strutture tri-dimensionali-prevede lo sviluppo e l'impiego di *bioinks* innovativi, oltre a software e hardware appositamente progettati. Bioinchiostri e computer insieme hanno la finalità di produrre tessuti o strutture ingegnerizzate utilizzabili nella medicina rigenerativa o come materiale per test e studi di tipo farmacologico. Esistono prospettive concrete per rendere il processo industrializzabile, con conseguenti vantaggi in termini di costi e diffusione.

2.2 I metodi di stampa

La **prototipazione rapida** è emersa come una tecnica potente per la produzione di scaffold per l'ingegneria tissutale; come già detto, permette di costruire un prototipo in maniera rapida ottenendo un modello definito e con una forma personalizzata tramite la progettazione assistita da computer (CAD). Sono stati sviluppati diversi sistemi di prototipazione rapida basati su tecnologie laser, di stampa o di estrusione. Tra questi, le stampanti 3D sono generalmente più veloci, più economiche e più facili da usare rispetto alle altre [19].

Di seguito sono presentate le 4 metodologie principali di stampa 3D.

Il **bioprinting a getto d'inchiostro** si basa sullo stesso principio delle stampanti a getto d'inchiostro tradizionali. Questo processo prevede l'inserimento nel dispositivo di una cartuccia di bioinchiostro, un idrogel carico di cellule assieme a fattori di crescita cellulare (Figura 2.2). Considerando il modo in cui il bioinchiostro esce dall'ugello, si possono distinguere i metodi a getto d'inchiostro continuo (*continuous inkjet printers* o CIJ) e *drop on demand* (DOD). Nel primo metodo, l'idrogel esce dal dispositivo di dosaggio in un flusso continuo; nel secondo metodo, le goccioline escono per attivazione, il che rende il processo più facile da controllare. Inoltre, il sistema DOD può ulteriormente differenziarsi in base al fattore di attivazione: termico, piezoelettrico o elettrostatico. Questi fattori vengono solitamente applicati all'uscita della cartuccia. L'attivatore termico riscalda una goccia di inchiostro e crea una bolla di gas che si rompe e spinge la goccia di bioinchiostro sulla superficie di stampa, mentre il vuoto creato nell'ugello aspira un'altra porzione di *bioink*. La stampa piezoelettrica utilizza il fenomeno piezoelettrico inverso, in cui le dimensioni di un cristallo con queste proprietà cambiano per effetto della tensione applicata. Nel processo di stampa elettrostatica a getto d'inchiostro, il *bioink* viene espulso dalla deformazione della parete della camera che lo contiene, camera controllata, in questo caso, da un campo elettrico attivato ad intermittenza [20]. In tutti i casi, si crea una goccia di *bioink* che viene erogata sulla superficie di stampa [10].

Il bioprinting a getto d'inchiostro è molto utilizzato rispetto ad altre tecnologie per la facilità d'uso, la velocità di stampa, il basso costo, la capacità di regolare la dimensione delle goccioline di *bioink*, la buona vitalità residua delle cellule e l'ottimo controllo sul modello di deposizione. I-principali ostacoli all'utilizzo di questo metodo sono: il requisito di bioinchiostri a bassa viscosità; le limitazioni nel software e nell'hardware che non permettono di lavorare con tutti i tipi cellulari; il possibile intasamento dell'ugello da parte di *bioink*, se denso e viscoso [11].

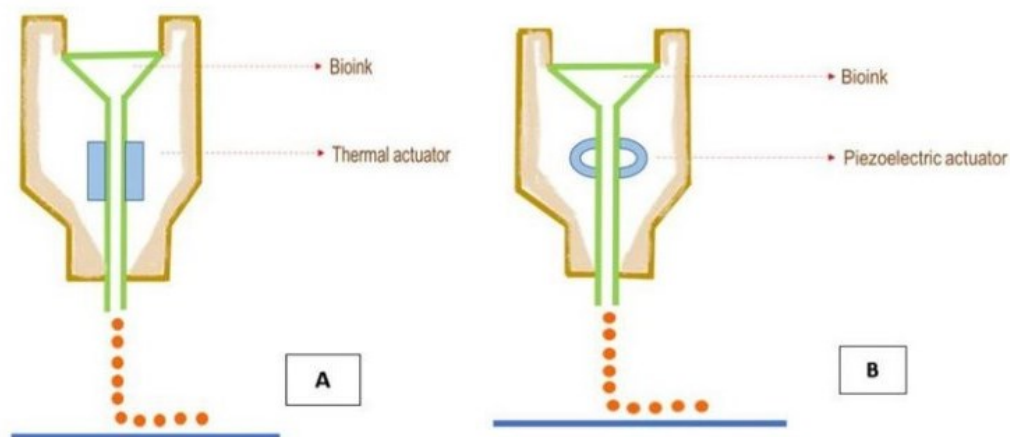


Figura 2.2: schema di bioprinting a getto d'inchiostro con (A) attuatori termici e (B) attuatori piezoelettrici.

Un secondo metodo di bioprinting si basa sul meccanismo di **estrusione**. Il *bioink* posto nel serbatoio viene spinto attraverso l'ugello dalla continua applicazione della pressione dell'aria [21] che fa sì che il bioinchiostro venga estruso ininterrottamente come un filamento cilindrico. Questo metodo, quindi, utilizza l'energia meccanica o pneumatica per estrudere il bioinchiostro attraverso l'ugello. L'estrusione pneumatica o l'estrusione meccanica a pistone o a vite sono le tre tecniche che solitamente guidano la fuoriuscita dell'inchiostro (Figura 2.3). La velocità di estrusione può essere facilmente modificata nei sistemi di estrusione pneumatica ed è altamente preferibile per le soluzioni a bassa viscosità [22]. I *bioink* ad alta viscosità possono essere estrusi facilmente con l'estrusione a pistone e la velocità di estrusione può essere modificata controllando il movimento del motore.

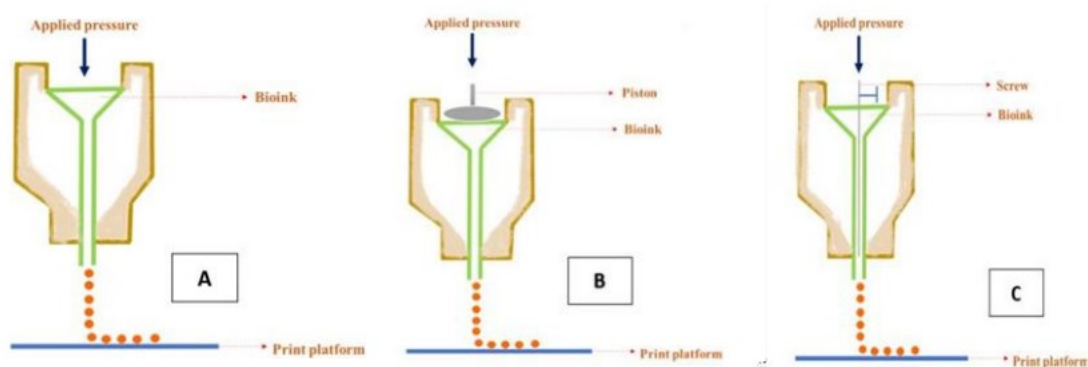


Figura 2.3: Schema del bioprinting basato sull'estrusione con metodi (A) pneumatici, (B) a pistone e (C) a vite.

Il processo di stampa a estrusione presenta l'indubbio vantaggio di essere relativamente semplice rispetto ad altri metodi. Consente la stampa di tessuti biologici nelle loro dimensioni originali, l'uso di soluzioni più viscosi di *bioink*, e permette densità cellulari più elevate rispetto alla biostampa a getto d'inchiostro. Inoltre, è meccanicamente stabile, permette di stampare un'ampia gamma di materiali anche con forme complesse, e gli aggiornamenti hardware e software necessari possono essere eseguiti molto facilmente [23]. Il principale svantaggio del bioprinting basato sull'estrusione è che può essere utilizzato solo per liquidi viscosi. Inoltre, presenta una risoluzione di stampa relativamente bassa e una velocità inferiore rispetto ad altri metodi [10]; l'intasamento dell'ugello può interrompere il processo [11].

Una tecnologia di stampa 3D che funziona con l'estrusione di materiali termoplastici è la **modellazione a deposizione fusa** (*fused deposition modeling* o FDM). È la forma di stampa 3D più diffusa. Mediante un ugello riscaldato che fonde il materiale, si deposita il polimero termoplastico su un piatto mobile strato dopo strato, fino al completamento dell'oggetto. Il

filamento viene spinto da due rulli fino alla punta dell'ugello dell'estrusore di una testina di stampa, dove viene riscaldato da unità di controllo della temperatura fino a raggiungere uno stato semi-fuso. Mentre la testina di stampa traccia il disegno di ogni strato orizzontale, il materiale semi-fuso viene estruso dall'ugello e si solidifica. Il piatto si sposta e un altro strato viene depositato nello stesso modo. L'intero sistema (Figura 2.4 (A)) consente di ottenere prototipi con le caratteristiche desiderate in tempi più brevi rispetto alle procedure tradizionali. Di solito, il principale svantaggio è la presenza di tracce sulla superficie degli oggetti a causa della deposizione del materiale estruso. Tuttavia, è stato provato che diverse caratteristiche, come scanalature e creste, influenzano la migrazione e l'orientamento di varie linee cellulari. Il controllo di questi aspetti può essere utilizzato per influenzare la crescita delle cellule e la loro organizzazione simile ai tessuti nativi.

Nel **bioprinting a microestrusione**, un robot estrude il materiale biologico attraverso un ugello di dimensioni micrometriche su uno scaffold o un substrato e deposita un flusso continuo di piccole perle di materiale biologico, come gli idrogel arricchiti di cellule (Figura 2.4 (B)). Ciò consente di utilizzare densità cellulari elevate, che raggiungono quelle riscontrate in condizioni fisiologiche [12].

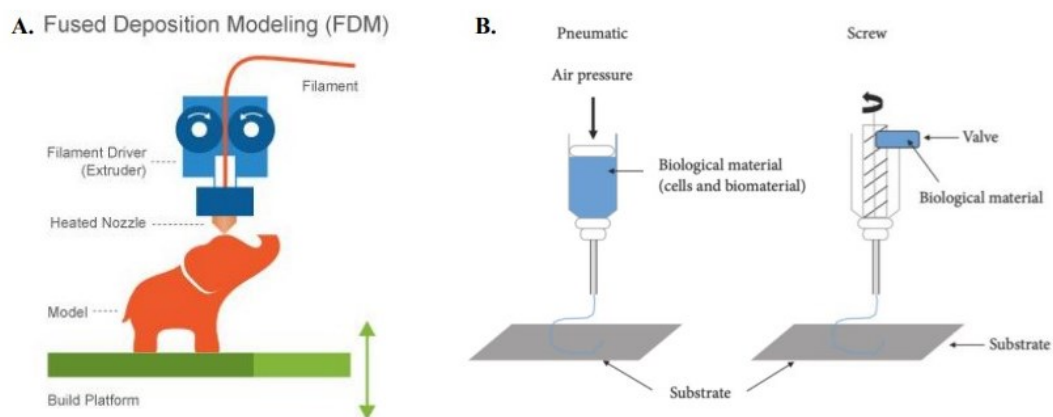


Figura 2.4: (A) Rappresentazione schematica del set-up di una stampante FDM; (B) sistemi pneumatici e meccanici utilizzati nelle stampanti a microestrusione [12].

La **biostampa laser assistita** utilizza un raggio laser pulsato e un nastro costituito da due strati: uno che assorbe il raggio, che da un lato è ricoperto dal *bioink*, e l'altro che è il nastro dove viene accolto il *bioink* stesso. Quando il raggio laser colpisce il nastro di stampa assorbente, l'energia raccolta produce un'elevata pressione gassosa che porta alla generazione e al distacco della goccia di bioinchiostro che si deposita sulla superficie di stampa (Figura 2.5).

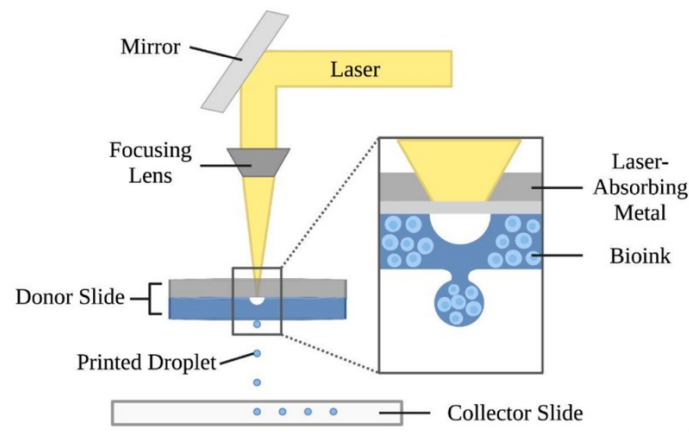


Figura 2.5: La biostampa laser assistita consiste in un raggio laser, una lente di focalizzazione e due piastre. La prima piastra è composta da uno strato metallico che assorbe il laser e da uno strato di bioinchiostro. Gli impulsi laser vaporizzano lo strato metallico e formano goccioline che vengono espulse sulla piastra collettrice sottostante [24].

Questa tecnologia consente la deposizione ad alta risoluzione di biomateriali in fase solida o liquida. I vantaggi della bioprinting laser assistito includono l'eliminazione dell'ostruzione degli ugelli e dei fattori di contaminazione, l'elevata vitalità cellulare attribuita al basso stress meccanico sulle cellule durante la stampa, un'ampia gamma di biomateriali utilizzabili e l'alta risoluzione. D'altra parte, il bioprinting laser assistito richiede tempo, è costoso, non è disponibile in commercio ed è in grado di produrre solo strutture di piccole dimensioni, con conseguenti applicazioni cliniche limitate [24].

Sempre basate sull'impiego di una sorgente laser controllata con precisione, la biostampa stereolitografica e il *digital light processing bioprinting* (DLP) sono due tra le tecnologie di biostampa maggiormente diffuse. Entrambe si basano sulla polimerizzazione di materiali fotoreticolabili (polimeri fotosensibili). La **biostampa stereolitografica** (SLA) è un metodo di fotopolimerizzazione che funziona utilizzando una sorgente di luce UV, un serbatoio di resina fotopolimerica liquida e una piattaforma che si muove sui tre assi (Figura 2.6 (A)). La piattaforma viene abbassata nel serbatoio contenente la resina, creando un sottile strato di liquido tra la piattaforma e il fondo del serbatoio. Il laser viene guidato attraverso una finestra sul fondo del serbatoio e polimerizza selettivamente il biomateriale su una prima sezione trasversale, secondo un disegno guidato da un computer. Una volta terminato uno strato, la piattaforma viene sollevata dal fondo consentendo alla resina fresca di fluire al di sotto. La piattaforma viene quindi nuovamente abbassata e il processo viene ripetuto. La stereolitografia è l'unica metodologia di fotopolimerizzazione che può essere utilizzata per stampare oggetti di grandi dimensioni con elevati livelli di risoluzione. Uno svantaggio è che le sorgenti di luce UV

sono costose e possono influire sulla vitalità cellulare; a quest'ultimo inconveniente si può ovviare con l'uso della biostampa stereolitografica a luce visibile [24].

Anche nel caso del *digital light processing bioprinting* (DLP) s'impiegano resine fotocurabili, materiali che solidificano con l'esposizione alla luce (Figura 2.6 (B)), ma mentre la stereolitografia utilizza un raggio laser UV per solidificare il *bioink*, il DLP utilizza un proiettore come sorgente luminosa. La solidificazione delle resine viene controllata spazialmente utilizzando un dispositivo a microspecchio digitale (DMD) L'array DMD riceve la luce incidente dalla lampada mentre l'orientamento di ogni singolo specchio viene regolato tramite un controller: la direzione e l'intensità della luce variano in dipendenza dall'orientamento degli specchi. Questo metodo ha come vantaggi un'elevata velocità di stampa e un'elevata precisione. Il principale svantaggio della stampa basata su DLP è che si possono stampare solo oggetti di piccole dimensioni (quindi in scala ridotta) e la stampante è molto costosa.

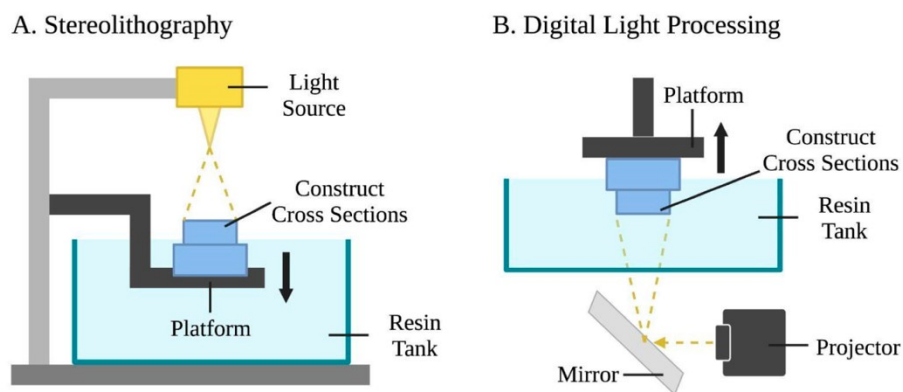


Figure 2.6. Rappresentazioni schematiche della stereolitografia e della DLP. (A) La stereolitografia utilizza una sorgente di luce, un serbatoio con una resina fotopolimerica e una piattaforma di movimento. Il laser disegna sezioni trasversali del costruito e la piattaforma viene abbassata dopo il completamento di ogni strato per far fluire la resina fresca al di sotto. Questo processo viene ripetuto strato per strato. (B) L'elaborazione digitale della luce utilizza un proiettore di luce e un dispositivo a specchio che riflette la luce in entrata. Interi strati di bioinchiostro vengono solidificati selettivamente e simultaneamente mentre la piattaforma si muove verticalmente [24].

La Tabella 2.1 presenta un confronto tra le diverse tecniche di stampa 3D più diffusamente utilizzate.

Process	Advantages	Disadvantages	Resolution	Cost	Speed	Viscosity	Ref.
Inkjet	Capacity to regulate the droplet size, Homogeneity, Directionality as well as its faster printing rate, Affordability, Low cost	Nozzle clogging, Non-uniform deposition, Viability of the cells should be greater than 85%	50 μm	Low	Slow	Less than 10 mPa/s	[91,116,118]
Extrusion	Simple, Affordable, Wide range of materials can be printed	Viscous liquids are needed, Printing speed is low, Cell viability is low	100 μm	Medium	Fast compared to inkjet printing	30 mPa/s to 6×10^7 mPa/s	[91,117,119]
Digital light processing	High print speed, High precision, High Resolution	Only small objects can be printed, Cost is high compared to other printing methods	20–200 μm	Very expensive Process	Speed varies according to the source of the laser beam and the size of the model to be printed	Nil	[117–120]
Stereolithography	No nozzle required. High accuracy Easily print complex structures	Resolution is limited, Cell toxicity, Reduced printing rate	100 μm	Low	Speed varies according to the curing rate and size of the object to be printed	1 to 300 mPa/s	[45,91,119]

Tabella 2.1: Confronto tra diverse tecniche di stampa 3D [11].

2.3 Gli scaffold: funzione e caratteristiche

La rigenerazione dei tessuti richiede un sostegno strutturale, simile alla matrice extracellulare (ECM), che consenta alle cellule di organizzarsi in maniera specifica. In assenza di tale sostegno, le cellule isolate non sono in grado di formare nuovi tessuti in modo spontaneo.

Qualsiasi tessuto è costituito da almeno un tipo di cellula circondata da una matrice e, in vivo, la ECM funziona come una piattaforma tridimensionale e multifunzionale per la crescita cellulare, definendo il microambiente corretto per la risposta e il comportamento delle cellule. Fornisce acqua, nutrienti, fattori di crescita, così come punti di ancoraggio e stimoli biofisici specifici. Ha la capacità di indurre l'adesione, la proliferazione, la migrazione, la maturazione delle cellule e, nel caso delle cellule staminali, fornisce i segnali per la differenziazione [25].

In vitro, e successivamente anche in vivo, il ruolo della ECM nei costrutti ingegnerizzati è svolto dagli scaffold che devono fornire alle cellule un microambiente 3D fisiologicamente adeguato. Gli scaffold sono dunque strutture create su misura che agiscono come matrici temporanee per le cellule, favorendone l'adesione eventualmente grazie alla presenza di specifici fattori biochimici. Molecole come fattori di crescita, glicani, peptidi bioattivi e proteine naturali come il collagene e la fibronectina, sono infatti in grado di favorire specifiche funzioni cellulari.

L'obiettivo comune è ottenere strutture con una porosità rigorosamente controllata e caratteristiche fisiche, chimiche e meccaniche adeguate simili a quelle del tessuto naturale. Per questo scopo, si può ricorrere anche alla decellularizzazione, un metodo che prevede l'ottenimento dello scaffold direttamente dalla matrice di un tessuto biologico rimuovendo le

cellule. L'obiettivo della decellularizzazione di tessuti è quello di rimuovere le cellule originarie e preservare al contempo l'architettura micro e macro della ECM, nella quale resta inalterata la nicchia per seminare le nuove cellule.

Per ottenere una matrice decellularizzata ottimale, è necessario considerare molti aspetti, tra cui la fonte del tessuto, le procedure di preparazione e l'efficacia della decellularizzazione. Inoltre, altri fattori come l'uso di agenti sterilizzanti devono essere tenuti sotto controllo, poiché possono influenzare la struttura della ECM finale [25].

Per preservare la micro/nano-struttura della matrice, la sua composizione e le proprietà biologiche, il metodo di decellularizzazione deve essere quindi selezionato opportunamente [26]. Esso è cruciale per il successo o il fallimento dell'innesto. Si devono, pertanto, considerare caratteristiche specifiche del tessuto di partenza come la densità cellulare, la densità della matrice, la geometria, lo spessore del tessuto e la forma.

Uno scaffold, quindi, è essenzialmente una matrice di sostegno su cui le cellule possono essere collocate finché non si sono aggregate, moltiplicate e organizzate in un tessuto completo. Inoltre, affinché queste fasi possano avvenire, si deve garantire un apporto costante di nutrienti e ossigeno alle cellule.

Negli studi di biologia cellulare, gli scaffold consentono di studiare in vitro i dettagli di processi cellulari fondamentali: interazioni e diffusione, crescita, proliferazione, migrazione, differenziazione, formazione di organoidi, ecc. In ciascuno di questi processi l'adesione fra cellule e supporto è fondamentale: la sua rigidità è un parametro critico dal momento che cellule diverse reagiscono in modo diverso a seconda delle caratteristiche meccaniche al supporto al quale devono aderire. Come già detto nel Capitolo 1, il modulo elastico dei tessuti naturali varia da centinaia di Pascal nel cervello o nel tessuto adiposo fino a decine di GPa nell'osso. Gli scaffold più morbidi sono più adatti per l'ingegneria dei tessuti molli, come appunto il tessuto cerebrale (modulo di Young, $E = \sim 0,5-1$ kPa), mentre i materiali più rigidi sono più efficaci per la rigenerazione dell'osso ($E \sim 1-10$ GPa). Quindi, riprodurre con successo in uno scaffold le diverse caratteristiche dell'ECM è estremamente impegnativo [12].

Altre caratteristiche importanti da considerare, affinché il tessuto stampato sia in grado di riprodurre il più fedelmente possibile le funzioni del tessuto naturale, nella progettazione dello scaffold sono la porosità e la morfologia superficiale. La porosità è importante per dare alle cellule lo spazio per moltiplicarsi e per facilitare il trasferimento di nutrienti e fattori di crescita, tra le cellule e l'ambiente circostante; i parametri di viscosità e tensione superficiale influiscono sulla cosiddetta "stampabilità" dell'idrogel [10].

Con il bioprinting si producono scaffold temporanei e biorisorbibili. Questo permette di parlare di un approccio solid-scaffold-free con l'obiettivo più ambizioso per il futuro di sviluppare una tecnica completamente scaffold-free, allontanandosi dalla metodologia tradizionale [18].

Pertanto, gli attuali costrutti ingegnerizzati possono essere sviluppati seguendo due approcci distinti: (i) uso di costrutti basati su scaffold che riproducono una struttura temporanea che supporti le cellule durante la formazione del tessuto; (ii) uso di costrutti privi di scaffold basati sulle capacità di autoassemblaggio di fogli cellulari, sferoidi o filamenti di tessuto a formare strutture più grandi. I vantaggi di lavorare senza scaffold sono la formazione più rapida del tessuto e l'assemblaggio controllato di blocchi eterogenei con diversi tipi di cellule. Ciò consente di imitare meglio l'architettura di tessuti e organi complessi. Tuttavia, questi costrutti presentano proprietà meccaniche inferiori rispetto a quelli basati su scaffold e richiedono un tempo supplementare per la fusione e la deposizione di ECM al fine di ottenere un costrutto coeso [27].

In ogni caso, l'utilizzo di scaffold tradizionali offre diversi vantaggi: tra gli altri, quello di assolvere alla necessità di un substrato su cui le cellule possono aderire per proliferare e quello di fornire la struttura porosa, ambiente ideale per il deposito delle cellule. Oltre alla funzione di adesione, il supporto consente la trasmissione di segnali per la migrazione e la differenziazione cellulare, che sono fondamentali per il corretto funzionamento di tessuti complessi come quelli umani.

Capitolo 3: Idrogel per il bioprinting

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati nuovi biomateriali, aventi diverse formulazioni, per soddisfare i requisiti richiesti dalle applicazioni di bioingegneria tissutale. Ad oggi, i biomateriali polimerici sono i materiali più comunemente impiegati nell'ingegneria tissutale. Tra essi, i più utilizzati sono gli idrogel, i quali possono essere caratterizzati, ad esempio, sulla base delle dimensioni delle catene polimeriche, del modulo elastico, della capacità di rigonfiamento e della velocità di degradazione. Ultimamente la ricerca si è concentrata sugli idrogel derivati da materiali biologici. Questi idrogel, infatti, possono essere derivati da polimeri proteici, come il collagene e l'elastina, e polisaccaridi come i glicosaminoglicani (GAG) e l'alginato, tra gli altri. È stato anche introdotto l'utilizzo di **tessuti decellularizzati** per la produzione di idrogel, tecnica che presenta diversi vantaggi rispetto all'uso di altri materiali, sia di origine naturale che sintetica. Nei tessuti decellularizzati, grazie alla conservazione di molecole naturali come fattori di crescita, glicani, peptidi bioattivi e proteine naturali, è possibile promuovere diverse funzioni cellulari come la crescita, la differenziazione, l'angiogenesi e la chemiotassi. Per esempio, nella maggior parte dei tessuti molli la conservazione del collagene, dell'elastina e dei GAG è fondamentale per mantenere la necessaria elasticità del tessuto: le fibre di elastina preservano le proprietà elastiche della struttura; il collagene serve a mantenere la resistenza alla trazione; i GAG forniscono la viscoelasticità [28]. Diverse matrici acellulari hanno ricevuto l'approvazione per l'uso clinico, ad esempio nelle valvole cardiache e nella vescica urinaria. Tuttavia, oltre ai numerosi vantaggi, le ECM di origine naturale spesso soffrono di immunogenicità, di possibile contaminazione da parte di agenti patogeni e di variabilità tra le preparazioni [12].

In generale, comunque, la versatilità degli attuali idrogel 3D rende possibili molteplici applicazioni e combinazioni con diverse molecole (agenti per il *cross-linking*, farmaci, fattori di crescita), al fine di ottenere le caratteristiche adeguate ad ogni peculiare finalità e/o tipo di cellula da depositare. Un materiale idrogel con le complete e significative proprietà richieste potrà essere utilizzato per diverse applicazioni, sia sperimentali che cliniche [29]. Ad esempio, gli idrogel sono tra i materiali più comunemente usati nella stampa 3D di supporti per la crescita di tessuti osteocartilaginei, dato che risultano intrinsecamente dotati di proprietà antiinfettive. Infezione e infiammazione, infatti, possono causare un'importante perdita di cartilagine articolare, e l'infezione può causare lesioni irreparabili alle articolazioni, così come alle ossa. La ricerca sulle proprietà antibatteriche degli idrogel è attualmente una delle più importanti aree di studio. Molto studiata è anche la struttura degli idrogel, poiché consente di comprenderne e

valutarne le proprietà meccaniche, la porosità, la permeabilità e altre caratteristiche chiave che influenzano l'efficacia degli stessi come scaffold per la stampa 3D di organi solidi [11].

Grazie alle loro proprietà uniche, soprattutto la capacità di incorporare cellule assicurando loro elevata vitalità, hanno trovato ampia applicazione nella produzione di bioinchiostri (come accennato nel precedente capitolo). Il presente capitolo (largamente ispirato alla review "Diversity of Bioinspired Hydrogels", 2023 di A. Gradinaru et al.) fornisce una panoramica riguardo i principali idrogel utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale e le particolarità di questi materiali.

3.1 Idrogel e le loro peculiarità

Gli idrogel sono polimeri formati da reti tridimensionali in grado di gonfiarsi e immagazzinare una quantità significativa di acqua. In base al modo in cui vengono costruite e modificate le reti polimeriche, gli idrogel possono essere distinti in due classi principali: (i) gel chimici e (ii) gel fisici. Gli idrogel chimici si ottengono sfruttando legami intra e intermolecolari, come il legame a idrogeno, le interazioni di van der Waals, legami covalenti o ionici, o comunque l'uso di alcuni agenti reticolanti. Gli idrogel fisici sono caratterizzati da interazioni non covalenti reversibili, ovvero intrecci fisici tra catene, che li rendono adatti all'incapsulamento delle cellule, ma altamente suscettibili alle condizioni ambientali (ad esempio, forza ionica, pH, temperatura, campo magnetico ed elettrico, pressione e radiazione luminosa) e anche piccoli cambiamenti possono causare il collasso della rete. Infatti, gli idrogel fisici presentano qualità meccaniche inferiori rispetto a quelli chimici [30].

Una delle caratteristiche essenziali degli idrogel sono le proprietà reologiche: nonostante siano per lo più liquidi, mostrano un comportamento reologico simile a quello di un solido. Possono anche subire importanti modifiche di volume come risposta a stimoli chimici e fisici: anche se la maggior parte dei cambiamenti volumetrici negli idrogel sono reversibili, per cui essi tendono a ritornare allo stato iniziale inalterato dopo la rimozione dello stimolo, queste eventuali modifiche ampliano la gamma di possibili applicazioni, sia che vengano ottenute utilizzando metodi fisici, sia che siano il risultato di una modifica chimica. Infatti, la densità di reticolazione, assieme al peso molecolare del monomero, può far variare la rigidità e l'impaccamento dell'idrogel.

Bisogna ricordare che nel caso dei polimeri, la densità di reticolazione e più in generale l'organizzazione strutturale, cioè il modo in cui le macromolecole si collocano nello spazio, è peculiare. Anche se alcuni polimeri (non tutti) possono essere lavorati in modo da ottenere un

elevato ordine spaziale, è comunque difficile arrivare ad una condizione di densità e di compattezza elevate.

Oltre a queste caratteristiche, ve ne sono altre da considerare. Ad esempio, la viscoelasticità: gli idrogel sono, cioè, materiali che hanno sia una componente elastica che viscosa, e le loro proprietà si collocano a metà strada tra le due. Da ciò potranno dipendere la resistenza meccanica sia alla compressione che alla trazione, o la capacità di assottigliamento al taglio [11].

È quindi importante valutare nel dettaglio anche le proprietà viscoelastiche di un idrogel all'interno della propria regione lineare di deformazione elastica, dove le sollecitazioni e le deformazioni sono linearmente proporzionali. Questa regione definisce l'intervallo di valori di deformazione di taglio che possono essere applicati al materiale senza rompere la sua struttura. Il modulo di taglio complessivo G^* descrive il comportamento viscoelastico dei materiali viscoelastici e può essere calcolato dal modulo di accumulo (G') e dal modulo di perdita (G''). G' deriva dal contributo elastico e rappresenta l'accumulo di energia, mentre G'' è il contributo viscoso e rappresenta la perdita di energia. G' rimane costante al di sotto di un valore critico dello sforzo di taglio, noto come sforzo di snervamento. Al di sopra della tensione di snervamento, G' diminuisce rapidamente e il materiale si comporta come un fluido viscoso [12].

3.2 Idrogel per la realizzazione di scaffold nella rigenerazione tissutale

Come detto più volte, gli idrogel sono materiali molto promettenti per una ampia gamma di applicazioni, grazie al fatto che, in virtù di un'adeguata progettazione strutturale e funzionalizzazione, possono essere modificati nelle proprietà fisico-chimiche e nelle caratteristiche di attività biologica per attivare specifiche funzioni cellulari. Soprattutto gli idrogel preparati a partire da macromolecole naturali, compresi i polisaccaridi e le proteine, risultano adatti per una grande varietà di applicazioni grazie alla loro somiglianza biochimica con la matrice extracellulare umana (ECM). Un ulteriore vantaggio è che i prodotti di degradazione di queste macromolecole sono riconosciuti e metabolizzati dall'organismo, trattandosi di sostanze già presenti nell'organismo umano [16]. Tali idrogel bioispirati presentano caratteristiche desiderabili per essere utilizzati nella progettazione di biomateriali per le applicazioni biomediche e terapeutiche (come già detto più volte, bassa tossicità, biocompatibilità, biodegradabilità, ma anche attività emostatica, antiossidante, antibatterica, antinfiammatoria, di riparo dei tessuti, reattività agli stimoli) e, soprattutto, sono largamente disponibili.

In letteratura sono state riportate diverse fonti di estrazione di polimeri naturali [31,32]. La maggior parte di questi polimeri proviene da fonti animali, da piante o alghe, ma è possibile ottenere biopolimeri anche attraverso processi microbici o enzimatici [33].

Gli idrogel di derivazione sintetica, invece, presentano i vantaggi di pesi molecolari e strutture chimiche definite, oltre a buone proprietà meccaniche, ottenibili mediante il controllo sui processi di sintesi. Possono essere prodotti industrialmente su larga scala e consentono un controllo accurato anche di altri parametri, come i tempi di degradazione, la forma e la porosità della struttura. I principali svantaggi riguardano la mancanza di specifici segnali per consentire il riconoscimento cellulare e questo provoca talvolta un'interazione indesiderata con l'ambiente biologico. Necessariamente, quindi, hanno una limitata biocompatibilità e biodegradabilità rispetto ai polimeri naturali. Pertanto, soprattutto in questi ultimi anni, si è cercato sempre di più di prediligere l'impiego di materiali di origine naturale, i principali dei quali sono schematizzati in Figura 3.1.

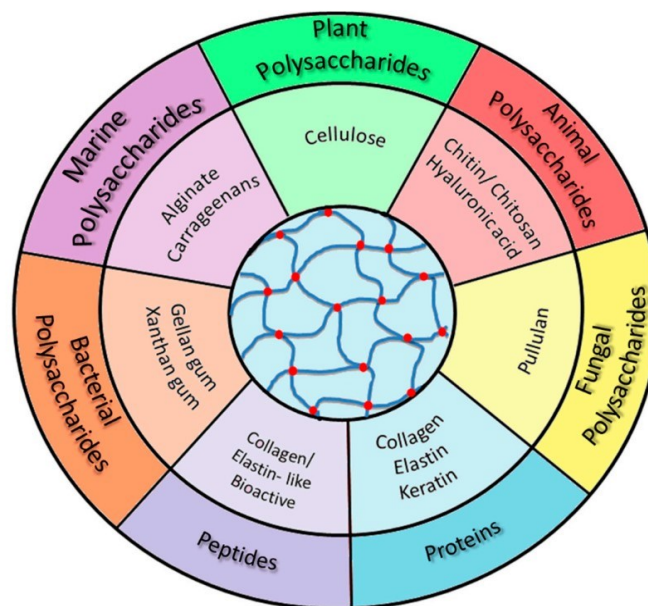


Figura 3.1: Principali tipi di biomolecole usate per lo sviluppo di Idrogel (immagine tratta da [16]).

Tra i polimeri utilizzati efficacemente come sistemi a base di idrogel, quelli più utilizzati come bioink includono alginati, cellulosa, acido ialuronico, chitosano e suoi derivati, la gomma gellano e la gomma xantana. Oltre a questi, nel presente capitolo, verranno discussi anche le seguenti proteine: elastina, collagene e fibrina. Un paragrafo a parte meritano i peptidi auto-assemblanti che rappresentano i materiali di ultima generazione sui quali la comunità scientifica sta puntando molto per la produzione di idrogel altamente ingegnerizzati.

Polisaccaridi

I polisaccaridi naturali usati per il bioprinting possono avere diverse origini: animali, piante, funghi o batteri. Nello specifico, le **cellulose** (Figura 3.2), si ricavano essenzialmente da organismi vegetali; soprattutto l'HPC (*hydroxypropyl cellulose*) è stata utilizzata per preparare idrogel che mantengono un'adeguata umidità per la guarigione delle ferite [34]. Grazie alla loro struttura, i materiali che si possono ottenere dalle cellulose presentano caratteristiche uniche, come la bassa densità, la tissotropia, la capacità di auto-riparazione e le eccellenti proprietà meccaniche (resistenza) e di barriera. A parte l'impiego classico per la produzione di carta e cartone, si possono utilizzare anche per la progettazione di nuovi materiali funzionali per idrogel, per stampa 3D, per veicolare la somministrazione di farmaci, e in generale, per applicazioni biomediche, sanitarie e alimentari.

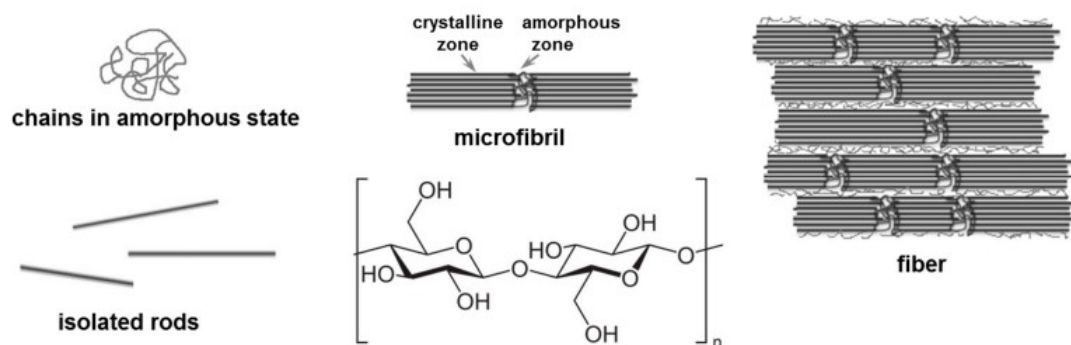


Figura 3.2: Conformazione della cellulosa a diversi livelli strutturali (immagine tratta da [16]).

L'**acido ialuronico (HA)**, d'altro canto, è una molecola naturalmente presente nei tessuti connettivi dei mammiferi. È facilmente isolabile e modificabile al fine di diminuirne la solubilità e migliorarne le proprietà meccaniche. Infatti, questo materiale se non modificato chimicamente, non è in grado di offrire un'adeguata resistenza meccanica. Mediante un processo di esterificazione si può indurre un certo numero di legami intermolecolari così che il composto acquisti caratteristiche di più facile processabilità (Figura 3.3). Oltre a modulare le proprietà meccaniche, il grado di esterificazione ne determina anche la velocità di degradazione [35].

Grazie alle sue proprietà antinfiammatorie, *anti-aging* e alla intrinseca biocompatibilità, l'HA e i suoi derivati sono utilizzati in numerose applicazioni biomediche come gli innesti di lembi di pelle e la riparazione di cartilagine, la rigenerazione dei tessuti, la guarigione delle ferite, la

coltura cellulare, il bioprinting 3D, la somministrazione di farmaci, oltre che in applicazioni cosmetiche [36, 37].

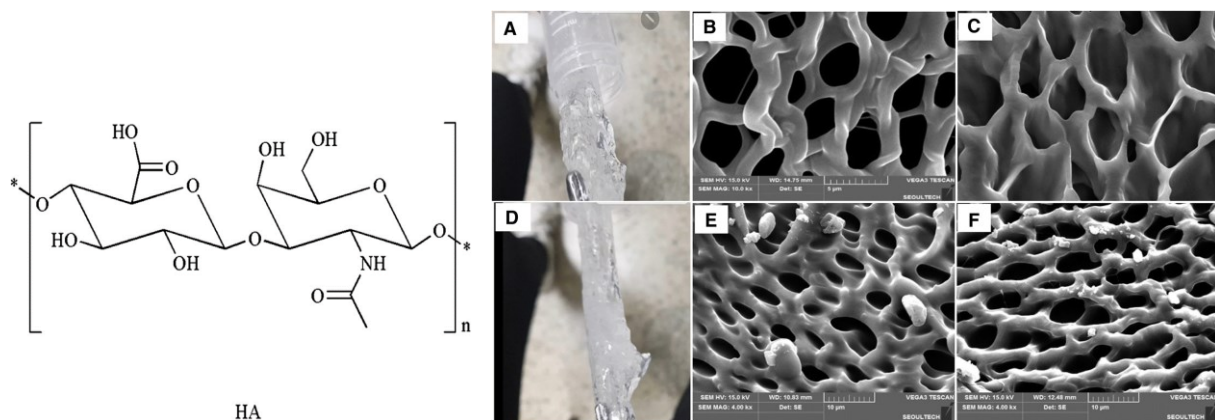


Figura 3.3: Struttura dell'acido ialuronico (sx) (immagine tratta da [38]); microscopia elettronica a scansione (dx): immagini digitalizzate di un idrogel a base di acido ialuronico (a,d), visione ingrandita della superficie (b,e) e della sezione trasversale (c,f) (immagine tratta da [39]).

Sempre tra i polisaccaridi, anche il **chitosano** rappresenta un materiale naturale utilizzabile per gli scaffold. Il chitosano presenta biodegradabilità, può stimolare la proliferazione delle cellule, favorendo la formazione del tessuto desiderato anche presentando architetture differenti, ottenibili applicando condizioni diverse e ben definite nella formazione dei gel [40, 41]. Di particolare interesse sono i polisaccaridi anfifilici in grado di sviluppare associazioni idrofobiche in idrogel autorigeneranti che recuperano la loro struttura e le loro proprietà originali dopo l'azione di uno stimolo esterno [42].

Altri materiali polisaccaridici trovano impiego nell'ambito dell'ingegneria tissutale, come per esempio l'**alginato** (Alg). Gli idrogel a base di alginati, nonostante la bassa stimolazione della adesione cellulare, hanno importanti capacità emostatiche, una grande somiglianza strutturale con la ECM, e presentano proprietà regolabili. Infatti, controllando le caratteristiche delle catene di Alg e i metodi di ottenimento, è possibile ottenere proprietà meccaniche diverse, fornendo un microambiente meccanicamente appropriato per diversi tessuti e quindi diversi impieghi. In generale, il modulo di taglio varia da 0,02 a 40 kPa e il modulo di compressione dei gel di alginato è stato trovato in un intervallo compreso tra meno di 1 kPa e più di 103 kPa [43]. Quindi, utilizzando la reticolazione fisica e/o chimica, l'alginato fornisce strutture versatili adatte agli scaffold per l'ingegneria tissutale, alle medicazioni per le ferite, al trasporto di agenti bioattivi (farmaci, proteine e agenti antimicrobici o antiossidanti) e rilascio controllato di farmaci [44].

Diverse strategie di stampa 3D, invece, utilizzano il *Gellan Gum* (GG, **gomma gellano**) per la fabbricazione di biomateriali di forme complesse [45]. È sufficiente l'aggiunta di una piccola quantità di GG (inferiore allo 0,5% dell'idrogel) per migliorare la stampabilità, aumentando così la fedeltà della forma e inducendo un miglioramento nel comportamento alla tensione di snervamento. È stato dimostrato che una specifica gelatina a base di metacrilato (GelMA) in presenza dello 0,5% di GG è un sistema adatto per la biostampa della cartilagine [45]. Invece, un elevato contenuto di GG (>0,5% GG) determina un aumento del valore di tensione di snervamento, rendendo difficile l'incapsulamento cellulare [46].

Infine, bioinchiostri porosi 3D che imitano le proprietà fisiche e meccaniche degli scaffold dei tessuti molli sono stati ottenuti anche da **gomma xantana** [47], rivelando proprietà viscoelastiche che consentono un buon controllo della struttura stampata con alta risoluzione e fedeltà di forma.

Proteine e peptidi

L'**elastina** è un componente dei tessuti connettivi, ai quali conferisce elasticità. Proprio per tale sua rilevante proprietà meccanica, è sempre di più un materiale interessante per la costruzione di scaffold. Con l'elastina si possono creare diversi idrogel ad alta porosità che sono impiegati in colture cellulari 3D e sistemi di rilascio di farmaci. Possiede, anche, l'interessante capacità di auto-assemblarsi in condizioni fisiologiche. Sebbene l'elastina sia una proteina molto importante per la struttura della ECM, viene impiegata nella produzione di idrogel con una frequenza inferiore rispetto ad altre proteine; questo perché quelle utilizzate nei biomateriali devono essere pure, e la purificazione dell'elastina dai tessuti animali è complicata dal fatto che in essi è strettamente intrecciata a microfibrille proteiche di altra natura e che in forma purificata è insolubile e tende a calcificare [48]. Durante il processo di purificazione, quindi, spesso si verificano contaminazioni che possono portare a risposte immunitarie da parte dell'organismo ospite. Un modo possibile per impiegare l'elastina è quello di miscelarla in piccola quantità ad altri tipi di idrogel naturali per migliorar le proprietà elastiche di questi ultimi. Particolarmente interessante per la creazione di scaffold vascolari, è appunto l'arricchimento con l'elastina dei gel di **collagene**. Quest'ultima macromolecola, anch'essa una proteina tipica dei tessuti connettivi, è utilizzata per la nota capacità di favorire l'adesione di cellule in coltura. I gel di collagene-elastina si sono dimostrati efficaci anche nella creazione di scaffold per la guarigione delle ferite cutanee (Figura 3.4) [49].

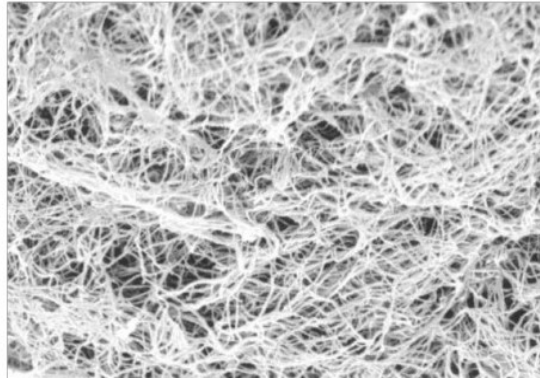


Figura 3.4: Esempio di matrice di elastina e glicosamminoglicano [49]

Parlando sempre di proteine, deve essere menzionato il **fibrinogeno**, macromolecola presente nel sangue e precursore della fibrina che, quando viene prodotta dal fibrinogeno mediante proteolisi, è responsabile della formazione del coagulo di sangue. La fibrina polimerizza sopra la ferita formando un'estesa rete di fibre. È, di fatto, un gel fibrillare che svolge un ruolo chiave come supporto nella rigenerazione del tessuto ferito e quindi nel processo di guarigione. Ai fini dell'ingegneria tissutale, il fibrinogeno può essere purificato dal sangue e utilizzato come fonte autologa per lo scaffold, attenuando o eliminando i rischi di incompatibilità immunologica [50]. Questi gel sono considerati una soluzione alternativa al collagene proprio per il fatto che sono facilmente ottenibili dal sangue del paziente [51]. Inoltre, alcuni studi riportano che le cellule cresciute in un gel di fibrina producono più collagene ed elastina rispetto alle cellule seminate in un gel di collagene [52] (Figura 3.5).

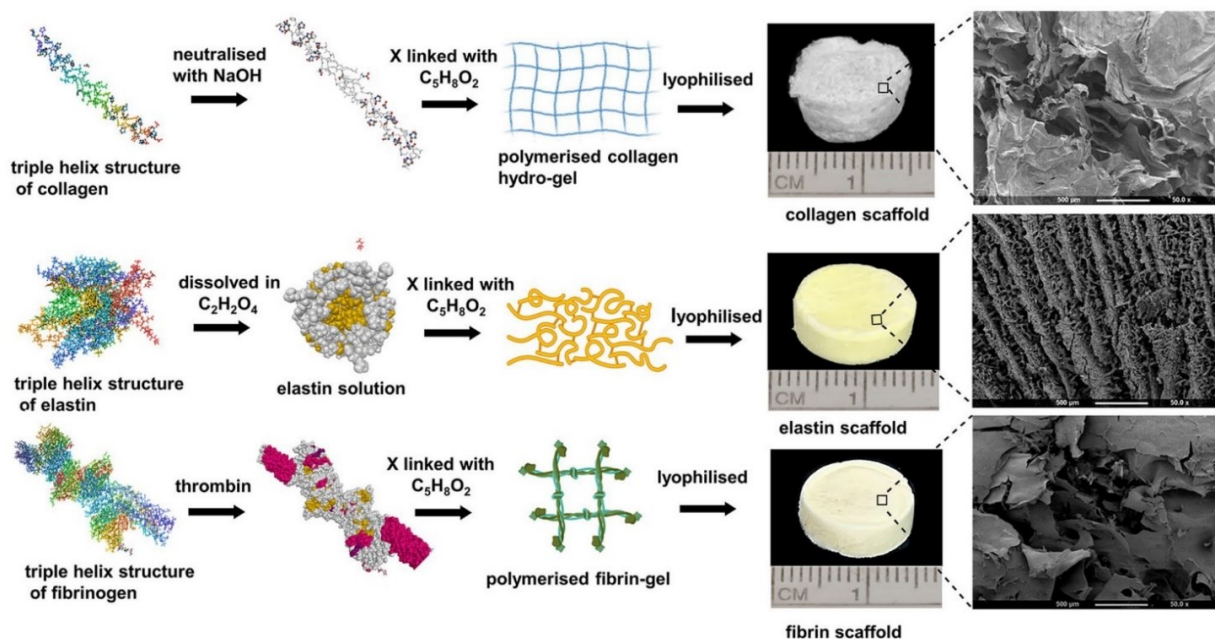


Figura 3.5: Rappresentazione schematica della fabbricazione di scaffold di collagene, elastina e fibrina con immagini di microscopia elettronica a scansione degli scaffold a 50× [53].

D'altra parte, come elementi costitutivi di vari biomateriali, i **peptidi** presentano diversi vantaggi: sono facili da sintetizzare e di conseguenza possono essere prodotti ad hoc, scegliendo sequenza e composizione (aminoacidi non polari, polari o carichi) precise. La selezione meticolosa della sequenza peptidica consente un certo livello di previsione dell'autoassemblaggio [54]. Inoltre, i peptidi possono conferire agli scaffold la capacità di rispondere agli stimoli esterni come la temperatura, il pH o la presenza di specifiche molecole. Essendo alcuni peptidi molecole endogene, riducono anche il rischio di effetti avversi.

Self-assembling peptides (SAPs)

Un tipo peculiare di peptidi utilizzati per la costruzione di scaffold sono quelli autoassemblanti (SAPs). Si tratta di brevi sequenze di aminoacidi (<40 aminoacidi) che formano idrogel con una struttura fibrosa simile a quella del collagene e consentono di regolare in modo indipendente la rigidità e la densità del sito di legame cellulare [55].

La tecnologia che li rende di grandissima attualità è la *click chemistry*, un approccio alla modificazione delle macromolecole biologiche che ha fruttato il premio Nobel per la Chimica del 2022 agli scopritori (Barry Sharpless, Morten Meldal e Carolyn Bertozzi). La *click chemistry*, infatti, permette di legare covalentemente molecole, anche complesse, in modo efficiente e selettivo in condizioni blande, non nocive per le cellule, e in solvente acquoso. La reazione chimica che viene sfruttata per modificare i peptidi è quella del tiolo-ene (tra un tiolo e un alchene per formare un tioetere) e può essere avviata dalla luce UV, consentendo quindi un controllo spaziale e temporale preciso del legame covalente che si viene a formare. Permette, quindi, di legare ai peptidi autoassemblanti una grande varietà di molecole dotate di gruppi funzionali utili a rendere più modulabile la composizione dei *peptide-based hydrogels*. I peptidi autoassemblanti funzionalizzabili attraverso la reazione tiolo-ene della click chemistry sono chiamati "Click SAPs".

Utilizzando la microscopia a forza atomica, si è dimostrato che i Click SAPs mantengono la capacità di auto-assemblarsi in fibre. È possibile così produrre una nuova serie di scaffold che mimano il microambiente cellulare con complessità e flessibilità spaziotemporali più elevate rispetto a quanto si potesse ottenere in precedenza. Si sta cercando sempre più di utilizzare materiali di questo tipo, o comunque materiali di origine biologica, non solo perché biocompatibili, ma perché talora biomimetici e bioattivi. Di conseguenza, l'inserimento in ambiente biologico di questi materiali facilita la creazione di connessioni e interazioni dirette a

livello biochimico con il tessuto biologico, stimolando specifiche attività nell'organismo e consentendo così la crescita del tessuto stesso sulla superficie del materiale [55].

Conclusioni e prospettive future

In generale, l'interesse per gli idrogel (HG) sta aumentando di anno in anno, come si può facilmente rilevare dal numero rapidamente in crescita di articoli scientifici pubblicati in letteratura. Difatti, gli idrogel stampati in 3D svolgono un ruolo importante nel campo della ricerca, soprattutto in quella medica. È inoltre incoraggiante che, grazie alle loro proprietà uniche, gli HG abbiano trovato un impiego insostituibile nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria dei tessuti.

Con il rapido progresso tecnologico e scoperte in altre discipline della scienza, sembra chiaro che le applicazioni degli HG oggi conosciute sono solo la punta dell'iceberg. Questo potenziale è ulteriormente amplificato dal fatto che ogni struttura HG può essere modificata, il che offre un numero infinito di combinazioni e possibilità illimitate di utilizzo in campo medico [34].

Tuttavia, sono ancora necessarie ulteriori attività di ricerca e sviluppo sui precursori degli idrogel e sui meccanismi di reticolazione e formazione. Anche la stampabilità 3D resta un problema da affrontare: per mantenere caratteristiche di citocompatibilità, la stampa dovrebbe essere sempre realizzata a temperatura ambiente; dovrebbe consentire la deposizione ordinata di cellule vive direttamente nel gel mentre viene stampato, con grande semplicità ed elevata efficienza (mentre ad oggi non è garantita al 100% la vitalità delle cellule nel tessuto stampato); dovrebbe permettere sempre il controllo dei parametri di stampa e delle caratteristiche (meccaniche, fisiche, biologiche, chimiche) del tessuto stampato in funzione della applicazione prevista [11].

Grandi aspettative si ripongono sugli idrogel di peptidi auto-assemblanti funzionalizzabili tramite *click chemistry*. Essi forniscono un microambiente fibroso alle cellule, consentendo, allo stesso tempo, all'utente di controllare i segnali biochimici e meccanici. Prima dell'avvento dei "Click SAPs", le indicazioni biochimiche venivano fornite introducendo le diverse macromolecole (carboidrati e proteine) semplicemente mescolandole fisicamente ai SAP prima dell'assemblaggio dell'idrogel. Questa procedura però limitava la flessibilità degli idrogel e ne aumentava i costi di produzione.

La piattaforma Click SAP non solo supporta una più facile funzionalizzazione con una più ampia gamma di molecole bioattive, ma anche consente un controllo temporale e spaziale del microambiente cellulare migliore rispetto a quanto si può ottenere con l'incorporazione dei segnali biochimici prima dell'assemblaggio del gel. Poiché la reazione tiolo-ene viene avviata con la luce, le applicazioni future potrebbero sfruttare questa caratteristica utilizzando fotomaschere o microscopia multifotone per esercitare un controllo temporale e spaziale

estremamente preciso, utile per imitare accuratamente gli aspetti della ECM nativa, che è intrinsecamente dinamica, complessa ed eterogenea, anche su scale dimensionali diverse. Inoltre, è possibile ottenere un'ampia gamma di rigidità del materiale, caratteristica fisiologicamente rilevante, regolando la concentrazione di SAP. Le cellule incapsulate nei Click SAP mantengono un'elevata vitalità e possono interagire con peptidi di adesione, grazie anche al fatto che le molecole incorporate mantengono la loro attività biologica [56].

La possibilità di controllare temporalmente le proprietà dei Click SAP potrebbe essere sfruttata per modellare il microambiente di malattie complesse e progressive, le cui proprietà biochimiche evolvono nel tempo. Anche le proprietà meccaniche potrebbero essere controllate temporalmente introducendo reticolanti per irrigidire i gel su richiesta. Per esempio, questo irrigidimento temporale potrebbe essere usato per studiare come le cellule rispondono alla transizione da un microambiente fisico normale a uno canceroso.

In sintesi, alcune molecole biologicamente attive possono essere "clicked" in idrogel composti da fibre di SAP, e i Click SAP funzionalizzati consentono di modulare comodamente varie caratteristiche meccaniche e biochimiche, mantenendo una microarchitettura fibrosa simile alla ECM stromale.

Considerate tutte le modifiche possibili, si può immaginare che i ricercatori le sfruttino per generare ECM biomimetiche con proprietà specifiche e regolabili. Tali ECM biomimetiche potrebbero servire come modelli che replicano meglio il microambiente in vivo, non solo per la riparazione di tessuti danneggiati, ma anche per studiare condizioni fisiologiche e patologiche, per il supporto allo studio e alla ricerca, come per esempio lo screening di farmaci, vaccini e terapie innovative [31].

Bibliografia

- [1] Di Bello, C., & Bagno, A. (2016). *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche* (Vol. 9, pp. 1-371). Pàtron editore.
- [2] Kaur, G., Pandey, O. P., Singh, K., Homa, D., Scott, B., & Pickrell, G. (2014). A review of bioactive glasses: their structure, properties, fabrication and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 102(1), 254-274.
- [3] Mironov, V., Visconti, R. P., Kasyanov, V., Forgacs, G., Drake, C. J., & Markwald, R. R. (2009). Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 30(12), 2164-2174.
- [4] Lee, Y. B., Polio, S., Lee, W., Dai, G., Menon, L., Carroll, R. S., & Yoo, S. S. (2010). Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture. *Experimental neurology*, 223(2), 645-652.
- [5] Madhusudanan, P., Raju, G., & Shankarappa, S. (2020). Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 17(162), 20190505.
- [6] Reilly, G. C., & Engler, A. J. (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of biomechanics*, 43(1), 55-62.
- [7] Parzel, C. A., Pepper, M. E., Burg, T., Groff, R. E., & Burg, K. J. (2009). EDTA enhances high-throughput two-dimensional bioprinting by inhibiting salt scaling and cell aggregation at the nozzle surface. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 3(4), 260-268.
- [8] Cui, X., & Boland, T. (2009). Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, 30(31), 6221-6227.
- [9] Vijayavenkataraman, S., Yan, W. C., Lu, W. F., Wang, C. H., & Fuh, J. Y. H. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 132, 296-332.
- [10] Chyzy, A., & Plonska-Brzezinska, M. E. (2020). Hydrogel properties and their impact on regenerative medicine and tissue engineering. *Molecules*, 25(24), 5795.
- [11] Kaliaraj, G. S., Shanmugam, D. K., Dasan, A., & Mosas, K. K. A. (2023). Hydrogels— A Promising Materials for 3D Printing Technology. *Gels*, 9(3), 260.
- [12] Bellet, P., (2021). Carbon-based scaffolds for tissue engineering: preliminary set-up and characterization. University of Padua.

- [13] Zidarič, T., Milojević, M., Gradišnik, L., Stana Kleinschek, K., Maver, U., & Maver, T. (2020). Polysaccharide-based bioink formulation for 3D bioprinting of an in vitro model of the human dermis. *Nanomaterials*, 10(4), 733.
- [14] Long, J., Etxeberria, A. E., Nand, A. V., Bunt, C. R., Ray, S., & Seyfoddin, A. (2019). A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109873.
- [15] Karvinen, J., & Kellomäki, M. (2023). Design aspects and characterization of hydrogel-based bioinks for extrusion-based bioprinting. *Bioprinting*, e00274.
- [16] Lupu, A., Gradinaru, L. M., Gradinaru, V. R., & Bercea, M. (2023). Diversity of Bioinspired Hydrogels: From Structure to Applications. *Gels*, 9(5), 376.
- [17] Bercea, M. (2023). Rheology as a tool for fine-tuning the properties of printable bioinspired gels. *Molecules*, 28(6), 2766.
- [18] Guillemot, F., Mironov, V., & Nakamura, M. (2010). Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication*, 2(1), 010201.
- [19] Peltola, S. M., Melchels, F. P., Grijpma, D. W., & Kellomäki, M. (2008). A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of medicine*, 40(4), 268-280.
- [20] Li, X., Liu, B., Pei, B., Chen, J., Zhou, D., Peng, J., ... & Xu, T. (2020). Inkjet bioprinting of biomaterials. *Chemical Reviews*, 120(19), 10793-10833.
- [21] Jeon, O., Lee, Y. B., Hinton, T. J., Feinberg, A. W., & Alsberg, E. (2019). Cryopreserved cell-laden alginate microgel bioink for 3D bioprinting of living tissues. *Materials Today Chemistry*, 12, 61-70.
- [22] Sun, J., Zhou, W., Yan, L., Huang, D., & Lin, L. Y. (2018). Extrusion-based food printing for digitalized food design and nutrition control. *Journal of Food Engineering*, 220, 1-11.
- [23] Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., & Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioactive materials*, 3(2), 144-156.
- [24] Wu, C. A., Zhu, Y., & Woo, Y. J. (2023). Advances in 3D Bioprinting: Techniques, Applications, and Future Directions for Cardiac Tissue Engineering. *Bioengineering*, 10(7), 842.
- [25] Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., & Boccafoschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30, 1-10.

- [26] Kawecki, M., Łabuś, W., Klama-Baryla, A., Kitala, D., Kraut, M., Glik, J., ... & Kasperczyk, A. (2018). A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix'scaffolds and their role in regenerative medicine. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(2), 909-923.
- [27] Ovsianikov, A., Khademhosseini, A., & Mironov, V. (2018). The synergy of scaffold-based and scaffold-free tissue engineering strategies. *Trends in biotechnology*, 36(4), 348-357.
- [28] Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews*, 89(3), 957-989.
- [29] Liu, Z., Xin, W., Ji, J., Xu, J., Zheng, L., Qu, X., & Yue, B. (2022). 3D-printed hydrogels in orthopedics: developments, limitations, and perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 845342.
- [30] Haraguchi, K. (2011). Stimuli-responsive nanocomposite gels. *Colloid and Polymer Science*, 289(5-6), 455-473.
- [31] Dumitriu, S. (Ed.). (2004). *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. CRC press.
- [32] Díaz-Montes, E. (2022). Polysaccharides: Sources, characteristics, properties, and their application in biodegradable films. *Polysaccharides*, 3(3), 480-501.
- [33] Smith, P. J., Ortiz-Soto, M. E., Roth, C., Barnes, W. J., Seibel, J., Urbanowicz, B. R., & Pfrenge, F. (2020). Enzymatic synthesis of artificial polysaccharides. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(32), 11853-11871.
- [34] Ogawa, A., Nakayama, S., Uehara, M., Mori, Y., Takahashi, M., Aiba, T., & Kurosaki, Y. (2014). Pharmaceutical properties of a low-substituted hydroxypropyl cellulose (L-HPC) hydrogel as a novel external dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 546-552.
- [35] Guardiani, J. A., (2010). Development of an experimental protocol for studying the effect of matrix stiffness on cell differentiation in cardiac tissue engineering. University of Milan.
- [36] Luo, Y., Tan, J., Zhou, Y., Guo, Y., Liao, X., He, L., ... & Liu, Y. (2023). From crosslinking strategies to biomedical applications of hyaluronic acid-based hydrogels: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123308.
- [37] Bukhari, S. N. A., Roswandi, N. L., Waqas, M., Habib, H., Hussain, F., Khan, S., ... & Hussain, Z. (2018). Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A

- review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International journal of biological macromolecules*, *120*, 1682-1695.
- [38] Wang, Y., Cai, L. Q., Nugraha, B., Gao, Y., & Leo, H. L. (2014). Current hydrogel solutions for repairing and regeneration of complex tissues. *Current Medicinal Chemistry*, *21*(22), 2480-2496.
- [39] Noh, I., Kim, N., Tran, H. N., Lee, J., & Lee, C. (2019). 3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering. *Biomaterials research*, *23*(1), 1-9.
- [40] Chen, Q., Chen, H., Zhu, L., & Zheng, J. (2015). Fundamentals of double network hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(18), 3654-3676.
- [41] Agate, S., Joyce, M., Lucia, L., & Pal, L. (2018). Cellulose and nanocellulose-based flexible-hybrid printed electronics and conductive composites—A review. *Carbohydrate polymers*, *198*, 249-260.
- [42] Huang, J., Zhao, M., Cai, Y., Zimmiewska, M., Li, D., & Wei, Q. (2020). A dual-mode wearable sensor based on bacterial cellulose reinforced hydrogels for highly sensitive strain/pressure sensing. *Advanced Electronic Materials*, *6*(1), 1900934.
- [43] Drury, J. L., Dennis, R. G., & Mooney, D. J. (2004). The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*, *25*(16), 3187-3199.
- [44] Abka-Khajouei, R., Tounsi, L., Shahabi, N., Patel, A. K., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2022). Structures, properties and applications of alginates. *Marine Drugs*, *20*(6), 364.
- [45] Cernencu, A. I., & Ioniță, M. (2023). The current state of the art in gellan-based printing inks in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 120676.
- [46] Mouser, V. H., Melchels, F. P., Visser, J., Dhert, W. J., Gawlitta, D., & Malda, J. (2016). Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication*, *8*(3), 035003.
- [47] Baniyadi, H., Kimiaei, E., Polez, R. T., Ajdary, R., Rojas, O. J., Österberg, M., & Seppälä, J. (2022). High-resolution 3D printing of xanthan gum/nanocellulose bio-inks. *International Journal of Biological Macromolecules*, *209*, 2020-2031.
- [48] Daamen, W. F., Hafmans, T., Veerkamp, J. H., & Van Kuppevelt, T. H. (2001). Comparison of five procedures for the purification of insoluble elastin. *Biomaterials*, *22*(14), 1997-2005.

- [49] Lamme, E. N., van Leeuwen, R. T., Jonker, A., van Marle, J., & Middelkoop, E. (1998). Living skin substitutes: survival and function of fibroblasts seeded in a dermal substitute in experimental wounds. *Journal of investigative dermatology*, *111*(6), 989-995.
- [50] Xu, M. M., Liu, R. J., & Yan, Q. (2018). Biological stimuli-responsive polymer systems: design, construction and controlled self-assembly. *Chinese Journal of Polymer Science*, *36*, 347-365.
- [51] Tagliazucchi, M., Azzaroni, O., & Szleifer, I. (2010). Responsive polymers end-tethered in solid-state nanochannels: when nanoconfinement really matters. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(35), 12404-12411.
- [52] Eslahi, N., Abdorahim, M., & Simchi, A. (2016). Smart polymeric hydrogels for cartilage tissue engineering: a review on the chemistry and biological functions. *Biomacromolecules*, *17*(11), 3441-3463.
- [53] Sawadkar, P., Mandakhbayar, N., Patel, K. D., Buitrago, J. O., Kim, T. H., Rajasekar, P., ... & García-Gareta, E. (2021). Three dimensional porous scaffolds derived from collagen, elastin and fibrin proteins orchestrate adipose tissue regeneration. *Journal of tissue engineering*, *12*, 20417314211019238.
- [54] Huang, C., Ye, Q., Dong, J., Li, L., Wang, M., Zhang, Y., ... & Jiang, Q. (2023). Biofabrication of natural Au/bacterial cellulose hydrogel for bone tissue regeneration via in-situ fermentation. *Smart Materials in Medicine*, *4*, 1-14.
- [55] Sharick, J. T., Atieh, A. J., Gooch, K. J., & Leight, J. L. (2023). Click chemistry functionalization of self-assembling peptide hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *111*(3), 389-403.
- [56] Khetan, S., & Burdick, J. A. (2011). Patterning hydrogels in three dimensions towards controlling cellular interactions. *Soft Matter*, *7*(3), 830-838.

Ritengo che la semplice riconoscenza non sia sufficiente per esprimere l'affetto che provo per queste persone. L'influenza che hanno avuto nella mia vita è profonda e tutt'ora in corso.

Detto ciò, non posso fare altro che ringraziare la mia famiglia, nello specifico la mia mamma, per essere una fonte di supporto e amore incondizionato. Le mie amiche Camilla, Elena e Marta per tutte le volte in cui mi avete dimostrato che "non importa dove mangiamo, basta che stiamo assieme": mi fate sentire fortunata, perché come voi non c'è nessuno. I miei amici Alberto, Lorenzo, Alice, Ketì e Arianna che mi hanno insegnato come certe sicurezze non si possano provare con chiunque.

Una menzione speciale (anzi specialissima) deve andare a Camilla, ElenaSofia, Filippo, Martina e Irene: non avrei raggiunto questo traguardo se non fosse stato per il vostro aiuto e la mia esperienza universitaria non sarebbe stata la stessa.

Infine, grazie a me c magg fatt nu cul taaaaant.