



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“IN SITU 3D BIOPRINTING PER LA RICOSTRUZIONE DI
DIFETTI OSSEI”**

Relatore: Prof. Bagno Andrea

Laureanda: Emma Chierгато

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024

Data di laurea 26/09/2024

Indice

Abstract	5
Introduzione	7
Capitolo 1. Bioprinting in situ e tecniche di stampa	9
1.1 Bioprinting in situ	9
1.1.1 Biostampa in vitro e biostampa in situ	9
1.2 Trattamento delle lesioni del tessuto osseo	10
1.3 Tipologie di stampa	11
1.3.1 Inkjet bioprinting	11
1.3.2 Laser-based bioprinting	13
1.3.3 Extrusion-based bioprinting	14
Capitolo 2. Tecnica scaffold-free e materiali di stampa	17
2.1 Tecnica scaffold-free	17
2.2 Bioink	18
2.3 Materiali polimerici	19
2.3.1 Poliesteri	20
2.3.2. Polisaccaridi	21
2.4 Caratteristiche fondamentali del bioink	22
2.4.1 Idrogel e meccanismi di reticolazione intercatena	23
Capitolo 3. Caso di studio	25
3.1 Calibrazione del braccio robotico	25
3.2 Composizione del bioink	25
3.3 Esperimenti in vitro in situ	27
3.4 Processo di stampa	28
Conclusioni	31
Bibliografia	33

Abstract

Negli ultimi anni, la ricerca scientifica volta al trattamento dei difetti ossei si è focalizzata sempre di più verso l'impiego della biostampa 3D. Questa tecnologia emergente, applicata in situ, prevede la deposizione del materiale di stampa direttamente nel sito lesionato tramite l'utilizzo di bracci robotici, per la creazione di tessuti biologici personalizzati.

Il presente elaborato si propone di fornire, in un primo momento, una panoramica sull'applicazione della tecnica in situ nella ricostruzione di tessuto osseo analizzando le principali biostampanti attualmente in uso. In seguito, sarà analizzata la tecnica di stampa scaffold-free che non prevede l'utilizzo di strutture di supporto per le cellule.

Dopo la valutazione meccanica e di biocompatibilità dei biomateriali utilizzati, verrà presentato ed illustrato un caso di studio.

Sebbene la biostampa in situ rappresenti ancora una tecnica emergente, non ancora applicabile nell'uso clinico, essa ha già mostrato evidenti potenzialità.

Introduzione

La ricostruzione dei tessuti ossei rappresenta una sfida significativa nel campo della medicina rigenerativa, spingendo sempre più spesso i ricercatori a sviluppare soluzioni innovative. I difetti ossei – in generale - non sono in grado di autorigenerarsi quando presentano una perdita circonferenziale superiore al 50% o una lunghezza maggiore di 2 cm nei pazienti adulti.

Le tecniche tradizionali prevedono l'uso di innesti ossei prelevati dal paziente stesso o da donatori esterni. Tuttavia, queste procedure, pur essendo ampiamente utilizzate, comportano diversi ostacoli, come il rischio di rigetto e di trasmissione di infezioni e la disponibilità limitata di tessuto osseo da utilizzare per l'innesto. Tali problematiche sottolineano la necessità di sviluppare approcci innovativi ed efficaci per la guarigione di questi difetti ossei.

Negli ultimi anni, la biostampa 3D in situ ha mostrato un grande potenziale per la rigenerazione di tessuti ossei, epidermici e cartilaginei. Il materiale utilizzato per la stampa, chiamato bioink, è composto generalmente da cellule non specializzate, materiali polimerici e fattori di crescita che promuovono la differenziazione cellulare.

La biostampa in situ prevede la deposizione del bioink direttamente nel sito del difetto osseo, utilizzando il corpo del paziente come un “bioreattore naturale”, favorendo così lo sviluppo e la differenziazione cellulare. Tecnologie come la scansione 3D e la progettazione grafica permettono di personalizzare il prodotto finale, rendendolo adatto anche alla ricostruzione di difetti con geometrie complesse e irregolari.

Questo elaborato ha l'obiettivo di esaminare le tecniche di bioprinting in situ per la rigenerazione dei tessuti ossei attraverso tre capitoli. Il primo capitolo fornirà una definizione di bioprinting in situ e confronterà queste tecniche con quelle di innesto tradizionali, analizzando successivamente i metodi di stampa compatibili con il bioink. Il secondo capitolo offrirà una panoramica sui componenti del bioink e sulle sue caratteristiche essenziali. Infine, nel terzo capitolo, verrà esaminato un caso di studio di ricostruzione ossea in situ su un modello suino.

Capitolo 1. Bioprinting in situ e tecniche di stampa

1.1 Bioprinting in situ

La biostampa in situ è un approccio innovativo sperimentale che consiste nella stampa di biomateriali contenenti cellule vive, matrici extracellulari e polimeri, chiamati bioinks, direttamente nel sito danneggiato. Ponendo particolare attenzione nella scelta dei materiali da utilizzare è possibile la realizzazione di tessuti complessi, tra i quali cartilagine, tessuto osseo ed epiteliale [1]. A differenza della stampa 3D convenzionale, questa tecnica propone la ricostruzione personalizzata di tessuti biologici danneggiati anche in casi complessi come, per esempio, geometrie singolari o superfici curve utilizzando delle tecniche all'avanguardia [2]. Tra queste figurano: biostampanti miniaturizzate montate su un braccio robotico che permette movimenti precisi, tecniche di scansione delle superfici in 3D ad alta definizione per acquisire la forma del sito lesionato, progettazione assistita da computer CAD e produzione assistita da computer CAM oltre all'impiego di sensori ed attuatori che permettono l'utilizzo della strumentazione anche da remoto [3]. Le tipologie di bioinks utilizzate sono diverse. Nel seguito, verranno analizzate le caratteristiche in relazione al tipo di inserto tissutale e alla biostampante utilizzata. I materiali maggiormente utilizzati comprendono due tipologie di idrogel: quelli a base di alginato e quelli a base di acido ialuronico. Negli ultimi anni sono state effettuate molteplici sperimentazioni su animali, evidenziando come la biostampa in situ rappresenti uno dei progressi più significativi nella ricostruzione dei tessuti e organi [4].

1.1.1 Biostampa in vitro e biostampa in situ

Uno dei metodi attualmente in uso per la ricostruzione dei tessuti danneggiati è l'innesto di tessuto autologo prelevato dal paziente, il quale è allo stesso tempo donatore e ricevente.

Questa tecnica sarà descritta in modo più approfondito nel paragrafo 1.2. Un'alternativa consiste nella fabbricazione di tessuti da impianto e prevede la loro produzione in vitro.

Il grande vantaggio della biostampa in vitro rispetto alle tecniche di innesto tissutale autologo, tra cui l'innesto di materiale osseo, risiede nella possibilità di personalizzazione. Grazie a sistemi di misura quali Tomografia Computerizzata (TC) e Risonanza Magnetica (RM) è possibile ottenere immagini tridimensionali specifiche dell'area interessata in tempi brevi [3]. La TC fornisce informazioni sulla struttura e sulla densità ossea, mentre la RM permette di valutare la qualità dei tessuti circostanti all'area danneggiata. La biostampa in vitro si svolge in laboratorio dove le condizioni di coltura cellulare possono essere controllate attentamente.

Nonostante i benefici, la biostampa in vitro presenta diverse limitazioni nell'applicabilità clinica. La manipolazione e l'impianto di strutture fragili risultano molto impegnative a causa della possibile

compromissione della forma ricercata. Inoltre, si presenta la necessità di un ambiente sterile di lavorazione. La forma del difetto tissutale acquisita tramite TC ed RM e successivamente ricostruito digitalmente tramite CAD potrebbe non corrispondere esattamente alle dimensioni reali del difetto a causa di errori nel corso della procedura di acquisizione comportando la non perfetta corrispondenza tra stampa e difetto originario.

L'approccio in situ risulta più vantaggioso in quanto elimina la necessità di replicare il microambiente naturale del ricevente, utilizzando il corpo come bioreattore [3], [5]. Inoltre, con l'utilizzo della tecnica in situ, vengono ridotti i problemi precedentemente esposti associati alla tecnologia in vitro, tra cui la possibilità di danneggiamento del prodotto in seguito a manipolazione e la possibilità di trasmissione delle infezioni.

1.2 Trattamento delle lesioni del tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato, costituito da cellule, gli osteociti, e dalla matrice extracellulare. La matrice extracellulare, ECM, è costituita da una parte organica ed una inorganica. La componente organica è sostanzialmente formata da collagene e proteine, mentre la parte minerale è fatta di sali minerali quali fosfato di calcio, fosfato di magnesio, fluoruro di calcio e carbonato di calcio. La parte cellulare è deputata alla produzione e al riassorbimento del tessuto osseo mediante il processo di rimodellamento. L'equilibrio che si instaura nell'organismo per il mantenimento del tessuto osseo dipende da fattori quali ormoni e stimolazione biomeccanica. In seguito a fratture di dimensioni ridotte, il tessuto osseo è in grado di eseguire un rimodellamento adattandosi alle necessità meccaniche dello scheletro. Nonostante ciò, se le fratture superano una certa lunghezza e profondità, il tessuto non riesce a rigenerarsi in maniera autonoma. Le lesioni ossee possono rappresentare il risultato di infezioni, neoplasie o traumi [4].

L'ingegneria tissutale ha lo scopo di rigenerare quelle parti che l'organismo naturalmente non sarebbe in grado di riprodurre. Il Gold Standard attuale per la guarigione di lesioni all'osso, è l'innesto di tessuto osseo autologo, ovvero prelevato dal paziente per essere poi riutilizzato nel sito danneggiato. Altra tecnica equivalente ampiamente utilizzata è l'innesto di tessuto osseo allogenico, il quale viene prelevato da un donatore umano e successivamente sterilizzato prima dell'uso per minimizzare il rischio di rigetto e trasmissione di malattie. Queste procedure forniscono ancora oggi risultati positivi in termini di proprietà meccaniche e microstrutturali.

Da non sottovalutare anche le possibili problematiche che possono sorgere quali rischio di rigetto, di trasmissione di infezioni e complicanze chirurgiche.

In aggiunta, innesti ossei autologhi e allogenici possono essere applicati solo a pazienti che rispondono ad ottime condizioni di salute, con una adeguata alimentazione e a specifiche condizioni meccaniche dell'osso, forme specifiche della ferita e ambiente biologico favorevole. I metodi tradizionali di innesti ossei autologhi e allogenici non sono sempre adatti in quanto applicabili solo ad un numero limitato di pazienti; se applicati a pazienti in età evolutiva, possono richiedere interventi multipli nel corso degli anni a causa di una mancata osteointegrazione. A seguito delle difficoltà sopra illustrate, le tecniche di ingegneria tissutale si prefiggono come obiettivo quello di realizzare un sostituto della parte difettata, il quale abbia proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto osseo originale e che non debbano subire modifiche nel corso della vita del paziente.

1.3 Tipologie di stampa

I principali metodi utilizzati nei test di biostampa in situ per la riparazione del tessuto osseo consistono nella biostampa a getto d'inchiostro, ad estrusione, e laser assistita. Nei prossimi paragrafi, saranno analizzati i diversi approcci, i vantaggi e le limitazioni (Tabella 1.1).

Tabella 1.1: Confronto tra le tecniche di biostampa considerate [1].

Parametri	Stampante Inkjet	Stampante Laser-assistita	Stampante ad estrusione
Costo	Basso	Alto	Moderato
Vitalità cellulare	> 85%	> 95%	40% – 80%
Velocità di stampa	Veloce	Media	Lenta
Viscosità supportate	3.5 to 12 mPa/s	Da 1 a 300 mPa/s	Da 30 mPa/s a 6×10^7 mPa/s
Risoluzione	Alta	Alta	Moderata
Qualità stampa verticale	Bassa	Media	Buona
Densità cellulare	Bassa $< 10^6$ cellule/mL	Media $< 10^8$ cellule/mL	Alta
Biomateriale utilizzato	Alginato, collagene	Collagene, Matrigel	Alginato, GelMA, Collagene
Applicazioni	Ingegneria tissutale (vasi sanguigni, tessuto osseo, cartilagine)	Ingegneria tissutale (vasi sanguigni, tessuto osseo, pelle, tessuto adiposo)	Ingegneria tissutale (vasi sanguigni, tessuto osseo, cartilagine, muscoli)

1.3.1 Inkjet bioprinting

Il metodo di funzionamento della biostampante 3D a getto d'inchiostro è analogo a quello della stampante a getto d'inchiostro 3D, per questo motivo il metodo economicamente vantaggioso per la sua produzione consiste nella modifica di una stampante esistente con l'aggiunta di un software dedicato e di un terzo asse di spostamento della testina di stampa [6]. Le parti fondamentali di cui si compone sono essenzialmente: un hardware per controllare la posizione della testina di stampa nello spazio, una cartuccia contenente il materiale di stampa e la testina della stampante.

La stampa può essere eseguita nelle modalità a getto continuo CIJ (Continuos Inkjet) o in quella On Demand [1]. Il primo metodo consiste nell'emissione di un flusso costante di materiale. Viene utilizzato in contesti in cui il requisito fondamentale è la velocità di stampa a discapito della precisione; ad esempio, per la creazione di strati uniformi o nella stampa di ampie superfici. La durata del processo può essere un parametro cruciale nella scelta dell'approccio da utilizzare poiché una velocità di stampa troppo bassa potrebbe rendere il processo impraticabile a livello clinico. Nella modalità On Demand, le gocce singole di inchiostro vengono dosate ed emesse in risposta ad un segnale elettrico che comanda un attuatore termico, elettrostatico o piezoelettrico (Figura 1.1). L'attuatore termico aumenta la temperatura locale del biomateriale di stampa fino alla creazione di una bolla gassosa che spinge le gocce verso l'uscita. Il segnale termico non trova applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale poiché il calore può provocare una diminuzione dell'attività cellulare e l'alterazione del materiale usato per la stampa [2]. Nel processo che utilizza i fenomeni elettrostatici la fuoriuscita del bioink è controllata da una variazione di dimensione della cartuccia data dall'attivazione intermittente di un campo elettrico. Nell'ultimo metodo vengono sfruttate le proprietà piezoelettriche; l'attuatore metallico con proprietà piezoelettriche modifica la sua forma quando viene applicata una tensione e spinge il biomateriale in uscita [6].

Rispetto alla modalità a getto continuo, quella On Demand genera gocce solo a richiesta dell'operatore, rendendo il processo più economico, facile da controllare e in grado di creare più facilmente i pattern voluti.

I materiali compatibili con la stampante includono idrogel, alginati e collagene, polimeri e piccole molecole idonee alla realizzazione di innesti di tessuto osseo. Gli idrogel, in particolare, sono adatti a questo tipo di stampa in quanto la loro viscosità può essere facilmente corretta.

I principali vantaggi della stampante a getto d'inchiostro comprendono il ridotto costo di produzione, l'elevata velocità di stampa, vitalità cellulare superiore al 80% ed un'alta precisione nella deposizione del materiale [2]. Tuttavia, tra gli svantaggi occorre considerare che le testine di stampa non operano adeguatamente con i bioink ad alta viscosità e ad alta densità cellulare. Ciò si traduce in una carente integrità strutturale e minore resistenza meccanica.

L'effetto di sedimentazione può rappresentare una complicazione poiché durante il processo di stampa le cellule si depositano sul fondo della cartuccia aumentando la viscosità del materiale.

Questo effetto si può osservare con l'uso di idrogel che gelifica all'interno della testina di stampa prima di depositarsi sul materiale causando l'otturazione dell'ugello ed impedendone la fuoriuscita [7]. Per ovviare a tale criticità si utilizzano tecniche di solidificazione tramite evaporazione o attraverso un cross-linker chimico. Altro aspetto critico è la dimensione non uniforme delle gocce.

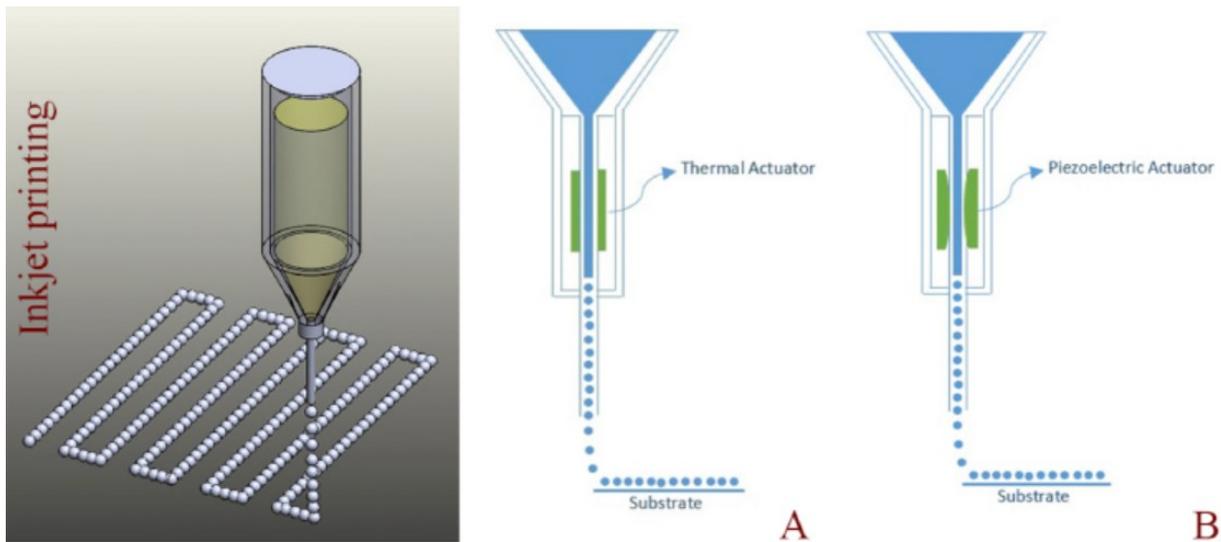


Figura 1.1: diagramma schematico del funzionamento di una stampante a getto d'inchiostro con attuatori (A) termici, e (B) piezoelettrici [8].

1.3.2 Laser-based bioprinting

La biostampante laser assistita è una tecnologia emergente che consente la stampa ad alta risoluzione a livello cellulare; la tecnica utilizzata è il trasferimento laser indotto (Laser-Induced Forward Transfer, LIFT). Questa tecnica fa uso di un vetrino (chiamato vetrino donatore) contenente il bioink il quale viene posto parallelamente alla superficie di stampa.

Al di sotto del vetrino donatore viene posta una lastra di metallo; il laser, con energie che variano da 65 nJ a 190 μ J, colpendo il metallo lo vaporizza ed il materiale cade per gravità sulla destinazione voluta (Figura 1.3). I metalli utilizzati sono tipicamente oro o titanio [2], [6].

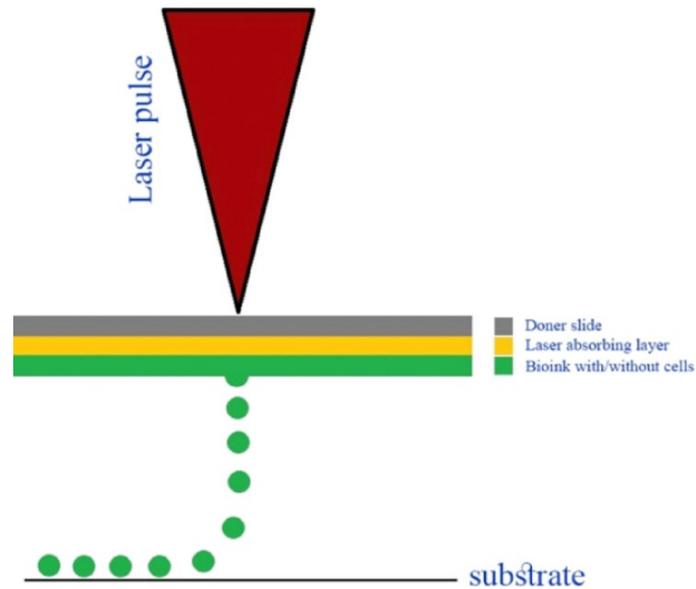


Figura 1.2: Diagramma schematico del funzionamento di una biostampante laser assistita [8].

I materiali polimerici contenuti nei bioink generalmente utilizzati sono idrogel, acido ialuronico, alginati oltre a collagene e cellule viventi.

Rispetto alle altre tecniche di stampa, la LIFT elimina il contatto tra la meccanica della stampante e il bioink. In questa maniera si evita lo stress meccanico delle cellule e si evitano contaminazioni [1]. I vantaggi principali di questa tecnica di stampa sono: la precisione elevata anche quando si debbano realizzare strutture complesse utilizzando biomateriali a fase solida o liquida, il controllo sul numero di cellule per goccia mantenendo la vitalità delle cellule maggiore del 95%. Il grado di definizione del prodotto finale dipende dalla viscosità del bioink e dalla sua risposta all'interazione con il raggio del laser. A differenza della stampante inkjet, è possibile l'impiego di materiali ad alta viscosità permettendo l'uso di una gamma più vasta di materiali. Gli svantaggi risiedono nel prezzo d'acquisto di diodi laser ad alta risoluzione ed intensità e nella complessità di realizzare il controllo del sistema. Inoltre, il processo richiede un lungo tempo di lavorazione, limitando le dimensioni delle strutture che possono essere realizzate [2]. La LIFT viene utilizzata principalmente in applicazioni in cui è fondamentale un'elevata precisione. La tecnica, pur essendo promettente, non è attualmente utilizzata in quanto i possibili effetti collaterali del laser sui materiali utilizzati non sono ancora stati analizzati a fondo [1].

1.3.3 Extrusion-based bioprinting

La biostampa ad estrusione nasce come evoluzione della stampa a getto di inchiostro con l'obiettivo di consentire l'uso anche di materiali viscoelastici attraverso il meccanismo di estrusione. Il materiale

posto sotto pressione fuoriesce dall'ugello di stampa in un unico filamento cilindrico. I metodi basati sull'estrusione si suddividono in estrusione pneumatica, meccanica (a pistone) o a vite. Nella tecnica pneumatica la forza estrudente è generata dalla pressione dell'aria mentre nelle altre due vengono sfruttate le forze verticali e rotazionali (Figura 1.3). Gli ugelli pneumatici possono gestire materiali con una gamma più ampia di viscosità rispetto alle altre due tecniche, ma offrono una minore precisione nella deposizione [1]. Gli ugelli a vite, invece, presentano problemi nella distribuzione di materiali ad alta viscosità. Rispetto alla biostampa inkjet, la biostampa ad estrusione permette di utilizzare materiali con densità cellulari più elevate a scapito della velocità e della risoluzione. I vantaggi includono un minor costo nella realizzazione dell'hardware oltre all'ampia gamma di materiali stampabili. Tuttavia, esiste il rischio di sottoporre il materiale ad una pressione troppo elevata causando maggior stress meccanico e riducendo la vitalità cellulare. Progettazioni recenti hanno modificato la stampante, consentendo l'uso simultaneo fino a sei bioink diversi.

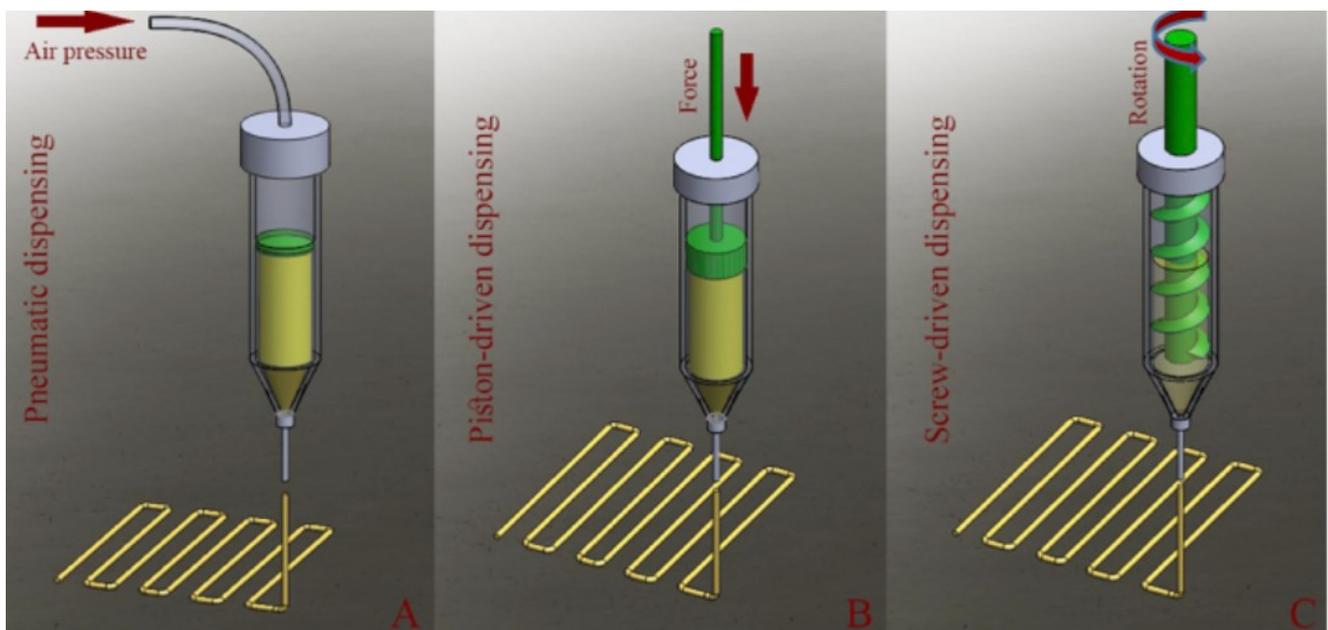


Figura 1.3: Rappresentazione del processo di biostampa per estrusione con erogatore A) pneumatico, B) meccanico a pistone, C) meccanico a vite [8].

Capitolo 2. Tecnica scaffold-free e materiali di stampa

Le tecniche utilizzate in ingegneria tissutale per la ricostruzione di tessuto osseo possono prevedere l'impiego di scaffold. Gli scaffold sono delle strutture temporanee, di origine biologica o sintetica, con la funzione di supporto strutturale delle cellule facilitandone l'adesione, la proliferazione, la differenziazione e l'organizzazione. Nonostante i progressi ottenuti con tale tecnica, la ricerca scientifica attuale si dirige verso lo sviluppo di metodologie che non prevedono l'uso di scaffold (tecnica scaffold-free, o 'cell-laden bioprinting'). La biostampa scaffold-free consiste nella deposizione diretta di biomateriali nel sito della lesione, eliminando la necessità di creare una struttura di sostegno sulla quale seminare le cellule: le cellule, il materiale biologico e quello polimerico vengono stampati senza l'ausilio di sostegni strutturali. La realizzazione di una stampa scaffold-free richiede lavorazioni complesse e attualmente, nell'ambito della ricostruzione del tessuto osseo, è ancora in fase sperimentale. Nei paragrafi successivi verranno illustrate le caratteristiche della tecnica scaffold-free e verrà analizzata la composizione del materiale di stampa insieme alle proprietà necessarie per il suo utilizzo.

2.1 Tecnica scaffold-free

La tecnica scaffold free prevede la biostampa di composti contenenti cellule ossee, fattori di crescita e materiali polimerici direttamente sul sito danneggiato (Figura 2.1). La struttura stampata sarà temporanea e soggetta ad un processo di degradazione, i cui sottoprodotti verranno progressivamente metabolizzati ed eliminati. Il costrutto sarà definitivamente sostituito da neo-tessuto osseo che l'organismo svilupperà grazie alla proprietà osteorigenerativa.

Il tessuto osseo è altamente vascolarizzato e l'apporto di sangue è necessario per il suo sviluppo, rimodellamento e rigenerazione. Un adeguato flusso sanguigno assicura l'approvvigionamento di nutrienti essenziali, ossigeno, fattori di crescita e ormoni, tutti elementi necessari alla rigenerazione ossea. In determinate circostanze, ad esempio in caso di elevata densità cellulare, i tessuti possono andare incontro a necrosi a causa della scarsa vascolarizzazione.

Oltre che da cellule, il tessuto osseo è costituito anche dalla matrice extracellulare che fornisce supporto strutturale e facilita l'organizzazione cellulare. Le cellule sono in grado di generare la matrice extracellulare e altri fattori necessari per la crescita dei tessuti. Si evidenzia la necessità dello sviluppo di un costrutto che permetta di replicare adeguatamente queste caratteristiche biologiche.

Per rispondere a questa esigenza, i materiali utilizzati nella biostampa in situ devono includere anche fattori di crescita cellulare e fattori angiogenici, per stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni.

Risulta inoltre necessario l'impiego nella composizione del bioink di un materiale polimerico in grado di fornire un adeguato supporto strutturale. Le caratteristiche di rigidità meccanica del materiale stampato devono essere quanto più possibile simili a quelle della matrice extracellulare. Il tessuto osseo possiede un modulo di Young di circa 1-10 GPa [9], [10].



Figura 2.1: Biostampa ex vivo con tecnica scaffold-free eseguita utilizzando un dispositivo di stampa portatile sul difetto osseo di un topo eutanizzato [11].

2.2 Bioink

I bioink sono materiali costituiti da cellule e biomateriali generalmente di natura polimerica.

Nella ricostruzione di lesioni del tessuto osseo, le cellule utilizzabili nei bioink possono essere suddivise in due categorie principali: le cellule indifferenziate (per es., cellule staminali mesenchimali), e quelle differenziate (per es., osteoblasti, cellule endoteliali e Human Umbelical Vein Endothelial Cells, HUVECs). Le cellule specializzate vengono prelevate direttamente dal paziente per minimizzare il rischio di risposte immunitarie indesiderate e sono immediatamente utilizzabili. Le cellule endoteliali, prelevabili da individui adulti, risultano essenziali per la creazione di una rete vascolare all'interno del nuovo tessuto formato.

Quando si utilizzano cellule indifferenziate, è necessario inserire anche fattori di crescita nella composizione del bioink per guidarne la differenziazione.

Le cellule staminali mesenchimali, comunemente utilizzate negli esperimenti di ricostruzione ossea, possono essere estratte dal midollo osseo, dal tessuto adiposo e dal cordone ombelicale.

Grazie alla loro capacità di differenziamento in vari tipi cellulari, queste cellule facilitano il processo di guarigione di una lesione in maniera simile al processo naturale rendendole, per questo motivo, uno dei migliori candidati nel trattamento delle lesioni ossee.

Il numero di cellule ottenuto direttamente dall'estrazione dal paziente è normalmente insufficiente per l'uso clinico diretto; si deve necessariamente procedere ad un'espansione in vitro. Un elevato numero di cellule contribuisce a ridurre il tempo di trattamento in quanto abbrevia il processo di proliferazione cellulare durante il processo naturale di rigenerazione ossea. Dopo espansione, le cellule staminali vengono aggiunte al bioink con l'aggiunta di piccole molecole, come il desametasone, e micro-RNA, i quali promuovono i processi di differenziazione cellulare per indurre la differenziazione in osteoblasti [2], [12], [13].

I biomateriali per la biostampa di tessuti ossei dividono in polimeri naturali (p. es., alginato, collagene e acido ialuronico) e polimeri sintetici (p. es., PLA, PCL). L'inclusione di cellule tissutali nel bioink è fondamentale per ottenere tessuti che rispecchino il più possibile le caratteristiche del tessuto originario. La trattazione dettagliata dei biomateriali polimerici utilizzati si svilupperà nel paragrafo 2.3.

Nei bioink sono inseriti anche i fattori di crescita (molecole segnale), i quali promuovono la proliferazione e il differenziamento delle cellule ossee, oltre alla creazione di un sistema di canali vascolari.

Tra i fattori di crescita più utilizzati vi sono il fattore trasformante - β (Transforming Growth Factor - β , TGF- β) e il fattore di crescita insulino-simile (Insulin-like Growth Factors, IGFs) che stimolano la crescita degli osteoblasti. Altri fattori di crescita includono le Proteine Morfogenetiche dell'Osso (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), i fattori di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factors, FGFs) e il fattore di crescita Endoteliale Vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [14]. Nella selezione della composizione dei bioink è cruciale garantire la compatibilità tra cellule, biomateriali e ambiente circostante. Inoltre, la scelta nella composizione dei biomateriali utilizzati deve permettere una adeguata proliferazione e crescita cellulare, evitando di comprometterne limitarne la vitalità.

2.3 Materiali polimerici

I bioink sono composti da materiali polimerici che possono essere di origine sintetica o naturale, all'interno dei quali possono essere inclusi molecole segnale e fattori di crescita.

I polimeri di origine sintetica, generalmente non igroscopici, possiedono un'ottima resistenza meccanica, buona osteoconduttività, comportamento antibatterico e una ridotta bioattività. Le loro proprietà fisiche e chimiche risultano variabili e possono essere facilmente modificate.

La cinetica di degradazione può essere controllata in base alla composizione chimica e al peso molecolare della catena polimerica.

I poliesteri, una classe dei materiali polimerici, sono ampiamente utilizzati nelle tecniche in situ per la ricostruzione di tessuto osseo; i principali sono l'acido polilattico (Polylactic Acid, PLA) e il policaprolattone (Polycaprolactone, PCL). I poliesteri alifatici subiscono un processo di degradazione in situ producendo prodotti non tossici.

Al contrario, i polimeri di origine naturale sono generalmente igroscopici. Questi polimeri favoriscono l'integrazione e una buona vitalità cellulare, ma presentano una minore resistenza meccanica e una biodegradabilità variabile. Favoriscono un'alta adesione cellulare grazie alla presenza di molecole, come le integrine, che nei tessuti promuovono l'interazione tra cellule ed ECM offrendo ottima bioattività. Tra i materiali polimerici naturali più utilizzati vi sono l'acido ialuronico, l'alginato e il chitosano, che appartengono alla categoria dei polisaccaridi [15].

Tuttavia, i loro svantaggi includono una degradazione poco controllabile e scarsa resistenza meccanica.

Infine, tra i materiali di cui è composto il bioink sono inclusi anche gli idrogel, derivati da materiali polimerici sia di origine naturale che sintetica. La caratteristica principale degli idrogel è la capacità di poter immagazzinare una quantità significativa di fluidi senza provocare la dissoluzione del composto, permettendo così di simulare il comportamento e la struttura dei tessuti danneggiati.

2.3.1 Poliesteri

Il policaprolattone (PCL) è un poliesteri semicristallino alifatico il cui utilizzo è particolarmente adatto alla medicina rigenerativa grazie alle sue proprietà idrofobiche che rallentano la cinetica di degradazione per favorire lo sviluppo cellulare, il quale avviene in un ampio lasso temporale che va dai 3 ai 4 anni. Il PCL è dotato di buone proprietà meccaniche che lo rendono ideale come materiale di supporto. Tuttavia, presenta alcuni svantaggi, tra cui la scarsa biodegradabilità ed osteoconduttività.

Un altro polimero di origine sintetica impiegato nel campo della rigenerazione dei tessuti ossei è l'acido polilattico (PLA). Il PLA è un poliesteri con caratteristiche simili al PCL in termini di degradabilità, non tossicità e idrofobicità. A causa della sua scarsa osteoconduttività e rigidità

meccanica si evita il suo utilizzo in forma pura, ad esempio può essere combinato con l'idrossiapatite [16], [17].

2.3.2. Polisaccaridi

I polisaccaridi sono costituiti da carboidrati complessi formati dall'unione di monosaccaridi tramite legami glicosidici. I legami tra le molecole di monosaccaridi sono covalenti.

I polisaccaridi svolgono ruoli cruciali come riserva di energia, sostegno strutturale dei tessuti e comunicazione tra le cellule. Tra i polisaccaridi di più utilizzati nella rigenerazione del tessuto osseo vi sono l'acido ialuronico, l'alginate e il chitosano.

Le proprietà dei polisaccaridi dipendono da diversi fattori, quali: la natura dei monosaccaridi che li compongono, il peso molecolare, la lunghezza della catena, il grado di ramificazione e il tipo di legame acetalico. La struttura del polisaccaride è in grado di influenzare in modo significativo le proprietà specifiche del bioink, come la viscosità.

L'alginate è un polisaccaride costituito da unità alternate di β -D-mannuronato e di C-5 α -L-guluronato. Generalmente il termine 'alginate' si riferisce ai derivati dell'acido alginico e ai suoi sali. Tra questi ultimi, l'alginate di sodio trova utilizzo in molte applicazioni grazie alla solubilità in acqua e alla capacità di formare soluzioni stabili. Il peso molecolare dell'alginate è solitamente compreso tra $3,2 \times 10^4$ e 4×10^5 g/mol.

L'idrogel a base di alginate è ampiamente impiegato nei processi di bioprinting in situ grazie alla sua biocompatibilità, al basso costo e alla facilità di creare strutture 3D. Inoltre, l'idrogel di alginate possiede capacità emostatiche e ha una grande somiglianza strutturale con la ECM. Le proprietà meccaniche possono essere regolate modificando le catene di alginate e il processo di produzione, rendendolo così adatto a diversi impieghi.

Tra i polisaccaridi di origine animale è presente il chitosano, il secondo biopolimero più abbondante al mondo e, grazie alle sue proprietà di biodegradabilità e non tossicità, è il biomateriale naturale più utilizzato nella biostampa in situ di tessuti ossei. Il chitosano viene ottenuto tramite deacetilazione della chitina ed è costituito da unità di D-glucosamina e n-acetil-glucosamina. Risulta solubile in soluzioni a pH acido, inferiore a 6,5, ma insolubile in soluzioni a pH neutro o alcalino. Un'importante proprietà fisica consiste nella bassa temperatura di fusione (102,5 °C). Tuttavia, lo svantaggio principale del chitosano risiede nella sua bassa resistenza meccanica, con valori di resistenza a compressione di 28 KPa. Per superare questa limitazione, sono stati sintetizzati composti a base di chitosano con idrossiapatite, collagene, fosfato tricalcico e polimeri sintetici. Il chitosano possiede buone proprietà di incapsulamento cellulare, ma deve essere sempre associato ad altri materiali che

svolgano la funzione strutturale. L'idrossiapatite nanometrica (nHA) è un comune riempitivo per i biomateriali a base di chitosano nell'ingegneria tissutale ossea. La nHA, essendo simile all'idrossiapatite naturale delle ossa, offre numerosi benefici in termini di resistenza meccanica e promozione delle funzioni cellulari.

L'acido ialuronico (HA) è un eteropolisaccaride costituito dalla ripetizione di unità disaccaridiche di acido D-glucuronico e N-acetil-glucosammina e fa parte della famiglia dei glicosamminoglicani.

Nell'organismo umano, l'HA è presente nei tessuti connettivi ed è facilmente isolabile. Viene sintetizzato dalla maggior parte delle cellule del corpo, ma si ritiene che le cellule mesenchimali ne siano la fonte principale. Come altri polimeri naturali, i derivati dell'HA vengono utilizzati in numerosi campi della medicina rigenerativa a causa della scarsa resistenza meccanica della molecola pura che ne limita l'uso a poche applicazioni. Il peso molecolare può variare significativamente, all'interno di un ampio intervallo, influenzando parametri come la viscosità, il tempo di gelificazione, il modulo elastico, la diffusione molecolare e il processo di degradazione. Nel caso degli idrogel a base di HA per la biostampa in situ, il peso molecolare è tipicamente di 5×10^5 g/mol [18], [19], [20], [21].

2.4 Caratteristiche fondamentali del bioink

I parametri chiave nella scelta dei bioink sono molteplici: compatibilità con diversi metodi di stampa, biostampabilità, biomimesi risoluzione del prodotto finale, integrità strutturale e meccanica, biodegradabilità, e non immunogenicità. La scelta del bioink da utilizzare deve essere fatta mediando attentamente tra le varie caratteristiche. Ne vengono elencate alcune:

- **Compatibilità con le modalità di stampa.** Non tutte le modalità di stampa sono compatibili con ogni bioink. La stampa ad estrusione offre un'ampia compatibilità con una vasta gamma di bioink grazie alla possibilità di regolazione della dimensione dell'ugello, per evitare di danneggiare i materiali in uscita. I materiali altamente compatibili con la stampa ad estrusione sono i materiali polimerici e le cellule. Al contrario, le stampanti laser assistita e inkjet supportano difficilmente l'utilizzo di materiale cellulare, poiché può causare l'otturazione dell'ugello.
- **Vitalità cellulare.** I fattori che influenzano la vitalità cellulare in composti a base di idrogel comprendono la concentrazione dei materiali polimerici e il tempo di incapsulamento, che inizia dal momento in cui le cellule sono incorporate nell'idrogel. Uno studio condotto da Fedorovich nel 2008 ha confrontato la vitalità cellulare utilizzando diversi idrogel, tra i quali Matrigel, Pluronic® F-127, di alginato e di agarosio. Lo studio ha concluso che,

nell'immediato, nessuna variazione significativa è stata osservata. Tuttavia, a distanza di sette giorni dall'incapsulamento, la vitalità delle cellule incorporate in Pluronic® F-127 è scesa drasticamente al 20%, quelle in Matrigel e alginato si sono assestate al 90%, mentre quelle incorporate in agarosio sono scese al 70% [22]. Un altro fattore rilevante è la modalità di stampa: come mostrato nella Tabella 1.1 le percentuali maggiori di vitalità cellulare si ottengono utilizzando il metodo di stampa laser assistita.

- **Biomimesi.** La proprietà di biomimesi è la capacità di un bioink di replicare fedelmente le caratteristiche meccaniche, funzionali e chimiche del sistema biologico che va a sostituire.
- **Risoluzione di stampa.** La risoluzione dipende dal bioink utilizzato e dal processo di stampa. Nella stampa di cellule in idrogel la risoluzione ottenuta con l'uso della stampa laser-assistita sono $5.6 \pm 2.5 \mu\text{m}$ mentre nella stampa ad estrusione ed inkjet aumenta fino a $100 \mu\text{m}$ [23].
- **Integrità strutturale e meccanica.** Le proprietà meccaniche delle strutture stampate dipendono dai biomateriali polimerici utilizzati e dalla loro concentrazione. Una concentrazione minore rende favorevole la proliferazione e crescita cellulare ma dimostra proprietà meccaniche inferiori.
- **Degradabilità.** La degradabilità del bioink utilizzato nella biostampa in situ dipende dalla composizione e dalla concentrazione dei biomateriali utilizzati. Additivi esterni possono essere aggiunti alla miscela per modulare la velocità di degradazione. La velocità del processo di degradazione deve essere calibrata specificatamente in base all'applicazione finale.
- **Immunogenicità.** L'impianto di materiale, sia esso di origine naturale o sintetica, può scatenare la risposta immunitaria del ricevente. È stata studiata la risposta immunitaria attraverso test in vitro di proliferazione dei linfociti in seguito all'utilizzo del collagene di tipo 1 estratto dalla coda di ratto. La risposta immunitaria è lieve [24], [25].

2.4.1 Idrogel e meccanismi di reticolazione intercatena

I fattori che intervengono nel processo di solidificazione dei materiali polimerici costituenti i bioink e la rapidità di tale processo influenzano notevolmente la qualità del prodotto finale. I meccanismi di crosslinking, o meccanismi di reticolazione intercatena, si suddividono in fisici e chimici.

Nell'ambito della ricostruzione ossea, i polimeri attualmente utilizzati nelle stampe possono essere reticolati fisicamente anche senza l'utilizzo di fattori esogeni. Questo processo evita la possibile tossicità indotta da fattori esogeni, riducendo al minimo il rischio di contaminazione chimica del costruito stampato.

I meccanismi di crosslinking fisico comprendono il meccanismo di reticolazione ionica, le interazioni idrofobiche e i legami ad idrogeno. La reticolazione ionica si sviluppa tra catene polimeriche sfruttando la differenza di elettronegatività tra molecole aventi carica opposta. Gli ioni si attraggono elettrostaticamente e danno origine ad una rete polimerica reticolata. Il processo può essere interrotto utilizzando chelanti per invertire il processo di gelificazione. Le interazioni idrofobiche e il legame ad idrogeno dipendono dalla temperatura che può alterare la struttura dei bioink. Abbassando la temperatura, il processo di reticolazione può essere invertito. Alcuni degli idrogel che sfruttano i meccanismi di crosslinking fisico sono a base di agarosio e alginato.

I meccanismi di crosslinking chimico si basano sulla formazione di legami covalenti tra catene polimeriche e forniscono maggiore stabilità meccanica rispetto ai polimeri reticolati fisicamente. La reticolazione chimica può coinvolgere dei reticolanti esogeni che possono comportare reazioni indesiderate a contatto con i bioink o causare tossicità. I meccanismi più utilizzati di reticolazione chimica comprendono reazioni di condensazione, di foto-reticolazione e di reticolazione mediante formazione di basi di Schiff [25], [26].

Capitolo 3. Caso di studio

Nel presente capitolo viene esaminato uno studio sulla riparazione di un difetto osseo nel modello suino, impiegando la tecnica di stampa 3D in situ mediante l'ausilio di un braccio robotico su cui è montata la testina di una stampante 3D (Figura 3.1). Le fasi preliminari del test in vivo includono la calibrazione del braccio robotico, i test in vitro per la valutazione dell'accuratezza di stampa e la preparazione del bioink. L'obiettivo dello studio è valutare la fattibilità della riparazione di ampi segmenti ossei su modelli animali, sfruttando tecniche avanzate di biostampa tridimensionale in situ, e sviluppare un materiale di stampa che risponda ai requisiti meccanici e di compatibilità [27].

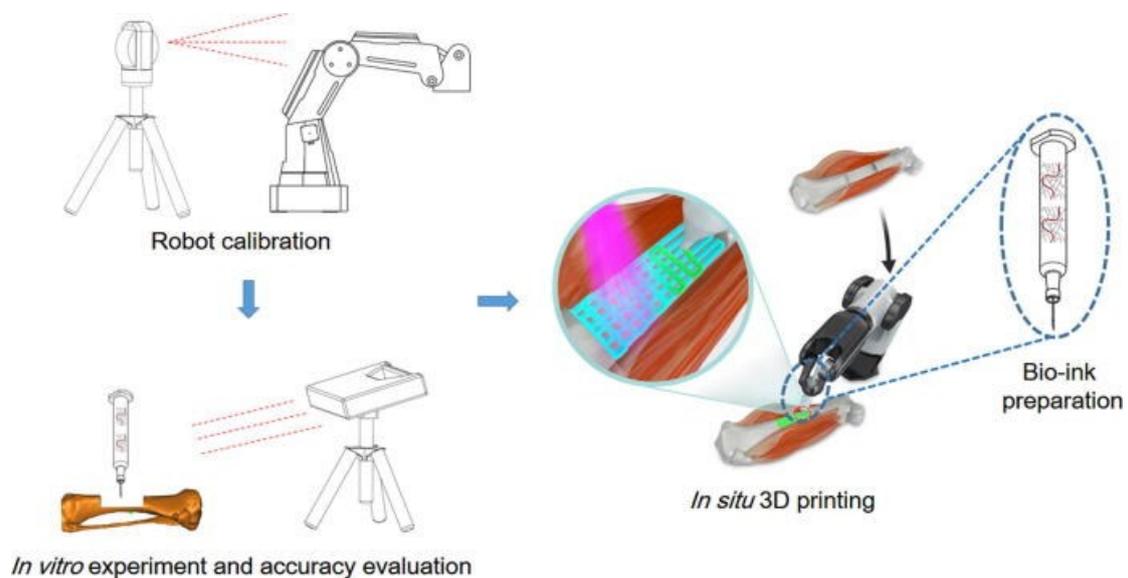


Figura 3.1: Fasi dello studio in vivo [27].

3.1 Calibrazione del braccio robotico

Nel presente studio, la calibrazione del braccio robotico si basa su una ricerca precedente riguardante la ricostruzione in situ di cartilagine tramite la stampante robotica industriale 6-DOF 3D [28]. La calibrazione rappresenta una fase cruciale della preparazione del test in vivo. Il problema riguardante lo spazio di lavoro limitato è stato parzialmente risolto con l'utilizzo di un robot a 4 gradi di libertà, che ha permesso di operare su superfici più ampie rispetto alla stampante tradizionale. Grazie al processo di calibrazione, l'accuratezza cinematica in questo studio ha raggiunto i 0.5 mm.

3.2 Composizione del bioink

I principali componenti dell'idrogel utilizzato come bioink includono alginato di sodio a media viscosità, diacrilato di polietilenglicole (PEGDA) con un peso molecolare di 700 kDa, e gelatina metacrilata (GelMA).

Il PEGDA, un polimero sintetico biocompatibile, contiene gruppi acrilati reattivi su entrambe le estremità, che consentono la sua solidificazione tramite fotopolimerizzazione o polimerizzazione UV. Gli idrogel a base di PEGDA con un peso molecolare superiore ai 400 kDa risultano non tossici, non immunogenici e facilmente eliminabili dall'organismo.

Dopo il processo di stampa e di fotopolimerizzazione, gli idrogel a base di PEGDA mostrano un'elevata resistenza meccanica e supportano l'adesione e proliferazione delle cellule incorporate nel bioink [29].

Il GelMA è derivato da collagene presente nei tessuti animali, consente la solidificazione tramite fotopolimerizzazione e permette di migliorare la resistenza meccanica del composto. L'utilizzo di GelMA nel bioink aumenta la viscosità, facilitando la stampa 3D [30].

Per la preparazione del bioink è stata formulata una soluzione di alginato di sodio al 6% (w/v) e 80 mM di CaCl₂, unite in egual volume per ottenere un idrogel parzialmente reticolato. Successivamente, sono stati aggiunti PEGMA al 10% (w/v), GelMA al 5% (w/v) e 0.05% I-2959, un fotoattivatore compatibile con le cellule.

La valutazione qualitativa alla quale è stato sottoposto il bioink consiste in prove di compressione meccanica, compatibilità cellulare, tempo di solidificazione con l'utilizzo di luci UV a diverse intensità. Le prove di compressione meccanica sono state effettuate utilizzando dei campioni cilindrici di altezza di 1 mm e diametro di 8 mm.

Per la valutazione di biocompatibilità, sono stati realizzati dei campioni cilindrici di altezza di 10 mm e diametro 8 mm, sui quali sono state seminate cellule C3T3-E1, precursori degli osteoblasti di topo, e sono stati aggiunti acido ascorbico e sodio β-glicerofosfato per stimolare la differenziazione cellulare.

La PCR quantitativa è stata effettuata ai giorni 7 e 21 per valutare i marcatori di differenziazione cellulare (Figura 3.2). In entrambe le analisi, i livelli di fosfatasi alcalina (ALP) sono risultati significativamente al di sopra rispetto ai valori di controllo. L'ALP è un enzima essenziale nella formazione di tessuto osseo, e viene utilizzato come indicatore della differenziazione cellulare [27].

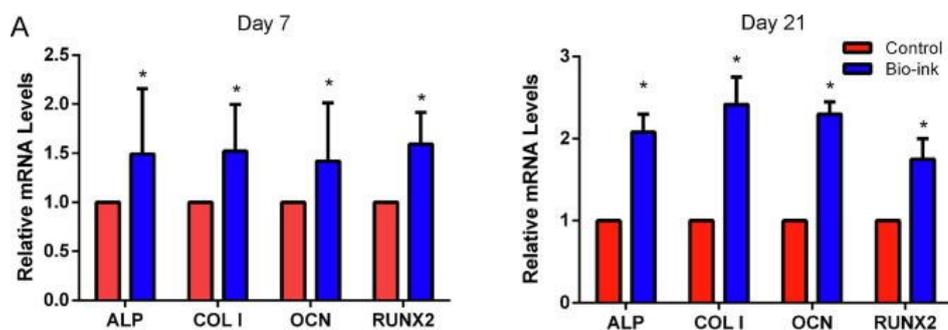


Figura 3.2: Espressione dei geni valutati tramite PCR al giorno 7 e 21 [27].

Tutti i componenti del bioink hanno subito un processo di sterilizzazione prima dell'uso, tramite esposizione a luce UV. La preparazione del composto è stata eseguita in ambiente sterile, seguendo le indicazioni di un precedente studio [31].

Il bioink impiegato si è dimostrato un materiale promettente per la rigenerazione ossea, consentendo il ripristino del volume del difetto osseo per oltre il 70% in un periodo di 12 settimane.

3.3 Esperimenti in vitro in situ

Prima di eseguire i test su modello suino in vivo, è stato necessario condurre prove in situ nella tibia isolata per assicurare la massima affidabilità degli strumenti utilizzati. Questi test sono stati condotti più volte, sia prima che dopo la compensazione degli errori (Figura 3.3).

L'osso integro è stato sottoposto a scansione mediante tomografia computerizzata, in particolare utilizzando il GE Lightspeed 16 TC, seguito dalla ricostruzione digitale 3D tramite il software MIMICS 19.0. Il modello 3D creato è stato poi utilizzato come riferimento per confrontare l'accuratezza del prodotto finale di stampa. Dopo la creazione del difetto e la successiva ricostruzione in situ, l'osso è stato nuovamente scannerizzato con uno scanner portatile (EinScan-Pro, Shining 3D, China). La valutazione qualitativa del test in vitro è stata infine eseguita tramite il software Geomagic Control [27].

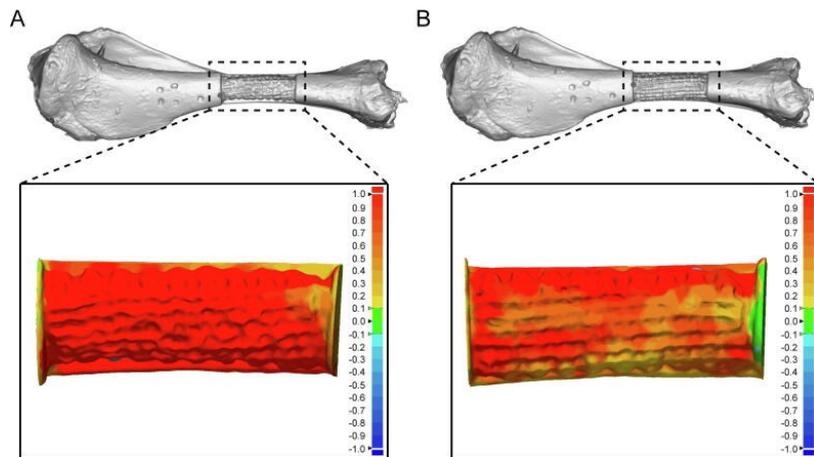


Figura 3.3: Risultati dei test eseguiti su tibia isolata: (A) campione di stampa prima del miglioramento dell'accuratezza, (B) campione di stampa dopo il miglioramento dell'accuratezza [27].

3.4 Processo di stampa

Successivamente alla somministrazione dell'anestesia, la tibia destra è stata esposta tramite un'incisione laterale. Il difetto osseo è stato creato a metà del segmento tibiale e il modello 3D corrispondente è stato creato con il software Magics 21.0.

Il difetto presentava una lunghezza di 30 mm, una larghezza di 16 mm e 14 mm rispettivamente alla distanza prossimale e distale, e una profondità di 7 mm.

Uno studio precedente ha dimostrato come la dimensione del diametro dell'ugello compreso tra 180 μm e 400 μm sia ottimale per la riparazione di tessuto osseo [31], [32].

La stampante utilizzata nel presente studio è un modello ad estrusione con diametro dell'ugello di 400 μm e una pressione di stampa di 0.3 MPa, montata su un braccio robotico posizionato vicino all'area chirurgica, con velocità di stampa di 6 mm/s e distanza di separazione tra due filamenti di stampa di 1.2 mm.

Dopo la deposizione di ciascun strato di bioink, il materiale di stampa è stato fotopolimerizzato con raggi UV ad intensità pari a 100 mW/cm^2 per garantire un'adeguata adesione tra i filamenti. Il filamento di bioink stampato, con diametro di 400 μm , veniva polimerizzato in meno di 10 secondi utilizzando l'intensità di luce UV di 150 mW/cm^2 (Figura 3.4).

La fotopolimerizzazione consente la reticolazione dei filamenti di bioink in pochi secondi, alterando minimamente le caratteristiche microstrutturali. Il livello di intensità luminosa utilizzato ha ridotto minimamente la vitalità cellulare.

Allo scopo di aumentare le possibilità di successo dei test in situ di ricostruzione ossea, è stato necessario un rapido processo di gelificazione.

Il bioink ha dimostrato ottime proprietà meccaniche con modulo di Young di 78.1 kPa, un limite di compressione del 33.89%, limite di stress di 60,46 kPa e una tenacità di 71,35 kJ/m^3 [27].

L'intera procedura di stampa è stata completata in 12 minuti (Figura 3.5). Al termine della ricostruzione del difetto, è stata necessaria l'applicazione di un fissatore esterno in titanio per garantire la resistenza dell'osso.

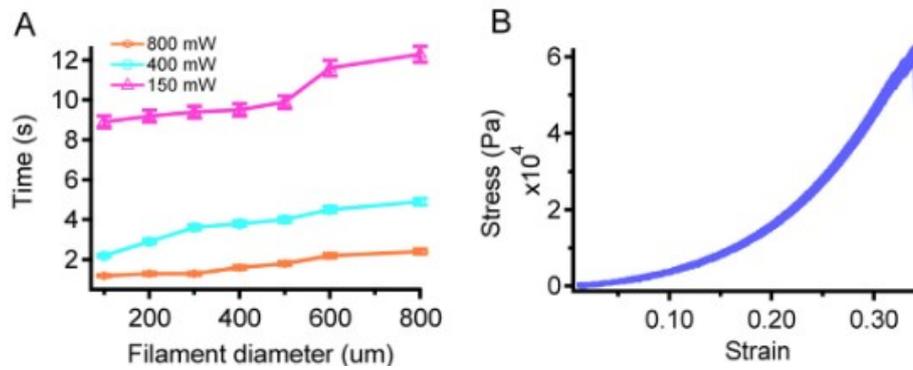


Figura 3.4: (A) Tempo di reticolazione dei filamenti di bioink utilizzando diverse intensità delle luci UV, (B) Prove di stress in compressione [27].

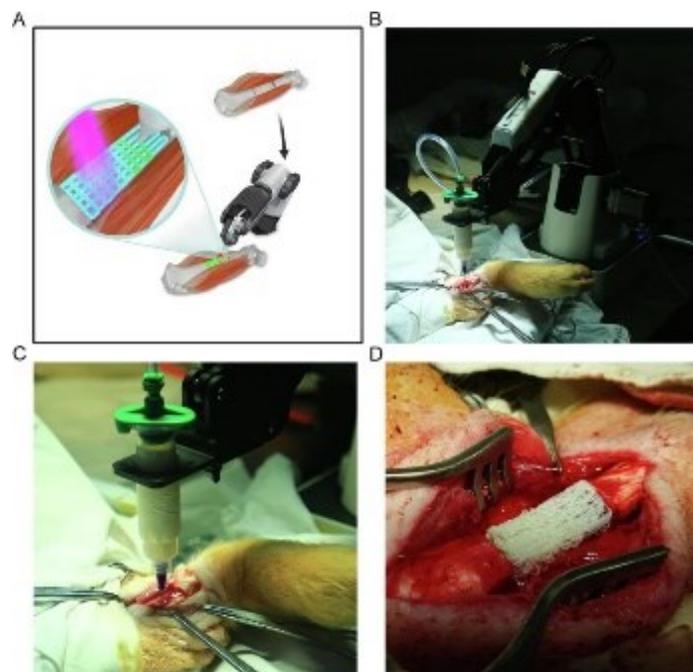


Figura 3.5: Processo di stampa in situ. (A) Rappresentazione grafica della stampa. (B) Stampante disposta sul braccio robotico. (C) Processo di stampa in vivo. (D) Struttura stampata [27].

Conclusioni

La biostampa è una tecnica avanzata di fabbricazione di tessuti complessi che utilizza cellule e materiali polimerici. Nel presente elaborato, sono stati analizzati i principali metodi di stampa 3D, basati sulle tecnologie Inkjet, laser-assistita e ad estrusione, discutendo di ciascuno vantaggi e svantaggi che riguardano la dimensione dell'ugello, la velocità di stampa e la risoluzione del prodotto finale.

Sono stati inoltre esaminati diversi materiali polimerici per offrire una panoramica delle composizioni di bioink più comunemente utilizzate. Grazie ai vantaggi intrinseci della biostampa in situ, come l'uso del corpo umano come bioreattore e l'eliminazione dei rischi associati agli innesti prefabbricati, questa tecnologia è oggetto di studi continui per il suo sviluppo. Tuttavia, esiste ancora la necessità di approfondire la ricerca su bioink più avanzati, migliorare la risoluzione dei processi di stampa e ottenere una maggiore somiglianza con i tessuti naturali. Inoltre, la ricerca si sta orientando verso lo sviluppo di sensori per monitorare i parametri critici durante il processo di stampa, oltre a nuove metodologie per aumentare la libertà di movimento e la precisione dei bracci robotici.

Nonostante si trovi ancora nelle fasi iniziali del suo sviluppo, la biostampa dimostra un grande potenziale in numerose applicazioni dell'ingegneria tissutale. Rimane una tecnologia emergente in continua crescita, con ampi margini di sviluppo.

Bibliografia

- [1] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, e D.-H. Kim, «3D bioprinting for engineering complex tissues», *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, fasc. 4, pp. 422–434, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.011.
- [2] C. A. Wu, Y. Zhu, e Y. J. Woo, «Advances in 3D Bioprinting: Techniques, Applications, and Future Directions for Cardiac Tissue Engineering», *Bioeng. Basel Switz.*, vol. 10, fasc. 7, p. 842, lug. 2023, doi: 10.3390/bioengineering10070842.
- [3] S. Singh, D. Choudhury, F. Yu, V. Mironov, e M. W. Naing, «In situ bioprinting - Bioprinting from benchside to bedside?», *Acta Biomater.*, vol. 101, pp. 14–25, gen. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.08.045.
- [4] L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson, e X. Jia, «Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair», *Acta Biomater.*, vol. 84, pp. 16–33, gen. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.039.
- [5] H. Gudapati, M. Dey, e I. Ozbolat, «A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future», *Biomaterials*, vol. 102, pp. 20–42, set. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.012.
- [6] M. Alonzo, S. AnilKumar, B. Roman, N. Tasnim, e B. Joddar, «3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy», *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, vol. 211, pp. 64–83, set. 2019, doi: 10.1016/j.trsl.2019.04.004.
- [7] G. S. Kalaraj, D. K. Shanmugam, A. Dasan, e K. K. A. Mosas, «Hydrogels-A Promising Materials for 3D Printing Technology», *Gels Basel Switz.*, vol. 9, fasc. 3, p. 260, mar. 2023, doi: 10.3390/gels9030260.
- [8] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, e M. Xing, «3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances», *Bioact. Mater.*, vol. 3, fasc. 2, pp. 144–156, giu. 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.
- [9] Y. He, L. Liang, C. Luo, Z.-Y. Zhang, e J. Huang, «Strategies for in situ tissue engineering of vascularized bone regeneration (Review)», *Biomed. Rep.*, vol. 18, fasc. 6, p. 42, giu. 2023, doi: 10.3892/br.2023.1625.
- [10] P. Jain, H. Kathuria, S. Ramakrishna, S. Parab, M. M. Pandey, e N. Dubey, «In Situ Bioprinting: Process, Bioinks, and Applications», *ACS Appl. Bio Mater.*, apr. 2024, doi: 10.1021/acsabm.3c01303.
- [11] A. Mostafavi *et al.*, «In situ printing of scaffolds for reconstruction of bone defects», *Acta Biomater.*, vol. 127, pp. 313–326, giu. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.009.
- [12] M. Kawecki *et al.*, «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», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 106, fasc. 2, pp. 909–923, feb. 2018, doi: 10.1002/jbm.b.33865.
- [13] O. Riestler, M. Borgolte, R. Csuk, e H.-P. Deigner, «Challenges in Bone Tissue Regeneration: Stem Cell Therapy, Biofunctionality and Antimicrobial Properties of Novel Materials and Its Evolution», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, fasc. 1, p. 192, dic. 2020, doi: 10.3390/ijms22010192.
- [14] C. Di Bello e A. Bagnò, *Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, 2. ed. Bologna: Pàtron, 2016.
- [15] C. Shi, Z. Yuan, F. Han, C. Zhu, e B. Li, «Polymeric biomaterials for bone regeneration», *Ann. Jt.*, vol. 1, pp. 27–27, nov. 2016, doi: 10.21037/aoj.2016.11.02.
- [16] F. Donnalaja, E. Jacchetti, M. Soncini, e M. T. Raimondi, «Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization», *Polymers*, vol. 12, fasc. 4, p. 905, apr. 2020, doi: 10.3390/polym12040905.

- [17] S. Tharakan, S. Khondkar, e A. Ilyas, «Bioprinting of Stem Cells in Multimaterial Scaffolds and Their Applications in Bone Tissue Engineering», *Sensors*, vol. 21, fasc. 22, p. 7477, nov. 2021, doi: 10.3390/s21227477.
- [18] A. Lupu, L. M. Gradinaru, V. R. Gradinaru, e M. Bercea, «Diversity of Bioinspired Hydrogels: From Structure to Applications», *Gels*, vol. 9, fasc. 5, p. 376, mag. 2023, doi: 10.3390/gels9050376.
- [19] I. L. Tsiklin, A. V. Shabunin, A. V. Kolsanov, e L. T. Volova, «In Vivo Bone Tissue Engineering Strategies: Advances and Prospects», *Polymers*, vol. 14, fasc. 15, p. 3222, ago. 2022, doi: 10.3390/polym14153222.
- [20] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, e L. F. Quiñones-Olvera, «Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine», *BioMed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1155/2015/821279.
- [21] A. Bharadwaz e A. C. Jayasuriya, «Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110698, mag. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110698.
- [22] N. E. Fedorovich, J. R. De Wijn, A. J. Verbout, J. Alblas, e W. J. A. Dhert, «Three-Dimensional Fiber Deposition of Cell-Laden, Viable, Patterned Constructs for Bone Tissue Printing», *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, fasc. 1, pp. 127–133, gen. 2008, doi: 10.1089/ten.a.2007.0158.
- [23] I. T. Ozbolat e Yin Yu, «Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends», *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 60, fasc. 3, pp. 691–699, mar. 2013, doi: 10.1109/tbme.2013.2243912.
- [24] S. V. Murphy, A. Skardal, e A. Atala, «Evaluation of hydrogels for bio-printing applications», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 101A, fasc. 1, pp. 272–284, gen. 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34326.
- [25] M. Hospodiuk, M. Dey, D. Sosnoski, e I. T. Ozbolat, «The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials», *Biotechnol. Adv.*, vol. 35, fasc. 2, pp. 217–239, mar. 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.006.
- [26] T. Genova, I. Roato, M. Carossa, C. Motta, D. Cavagnetto, e F. Mussano, «Advances on Bone Substitutes through 3D Bioprinting», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, fasc. 19, p. 7012, set. 2020, doi: 10.3390/ijms21197012.
- [27] L. Li *et al.*, «Robotic in situ 3D bio-printing technology for repairing large segmental bone defects», *J. Adv. Res.*, vol. 30, pp. 75–84, mag. 2021, doi: 10.1016/j.jare.2020.11.011.
- [28] K. Ma *et al.*, «Application of robotic-assisted in situ 3D printing in cartilage regeneration with HAMA hydrogel: An in vivo study», *J. Adv. Res.*, vol. 23, pp. 123–132, mag. 2020, doi: 10.1016/j.jare.2020.01.010.
- [29] S.-J. Song *et al.*, «Sodium Alginate Hydrogel-Based Bioprinting Using a Novel Multinozzle Bioprinting System: THOUGHTS AND PROGRESS», *Artif. Organs*, vol. 35, fasc. 11, pp. 1132–1136, nov. 2011, doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01377.x.
- [30] A. Bandyopadhyay, B. B. Mandal, e N. Bhardwaj, «3D bioprinting of PHOTO-CROSSLINKABLE silk methacrylate (SILMA)-polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) bioink for cartilage tissue engineering», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 110, fasc. 4, pp. 884–898, apr. 2022, doi: 10.1002/jbm.a.37336.
- [31] L. Li *et al.*, «In situ repair of bone and cartilage defects using 3D scanning and 3D printing», *Sci. Rep.*, vol. 7, fasc. 1, ago. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10060-3.
- [32] F. Yu *et al.*, «Evaluation of a polyvinyl alcohol-alginate based hydrogel for precise 3D bioprinting», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 106, fasc. 11, pp. 2944–2954, nov. 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36483.