



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“3D BIOPRINTING: BIOINKS UTILIZZATI E TECNICHE DI STAMPA
PER LA MEDICINA RIGENERATIVA”**

Relatore: Annj Zamuner

Laureando: Giovanni Brunetta

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024

Data di laurea: 27/09/24

INDICE

Abstract.....	pagina 5
Capitolo 1:3D Bioprinting: Considerazioni generali.....	pagina 6
1.1 Origini del Bioprinting.....	pagina 6
1.2 Ingegneria tissutale.....	pagina 7
1.2.1 Cos'è l'ingegneria tissutale?.....	pagina 7
1.2.2 Produzione di nuovo tessuto(neomorfogenesi).....	pagina 8
1.2.3 Approccio dell'ingegneria tissutale.....	pagina 8
1.2.3.1 Cellule.....	pagina 9
1.2.3.2 Semina su scaffold.....	pagina 10
1.2.3.3 Maturazione.....	pagina 10
1.3 Fondamenti di 3D Bioprinting.....	pagina 12
1.3.1 Modellazione 3D:CAD/CAM.....	pagina 13
1.3.1.1 Origini.....	pagina 13
1.3.1.2 Vantaggi CAD/CAM.....	pagina 13
1.3.2 Imaging biomedico per il Bioprinting.....	pagina 14
1.3.2.1 Tomografia assiale computerizzata.....	pagina 14
1.3.2.2 Imaging a risonanza magnetica(MRI).....	pagina 14
1.3.2.3 Imaging ad ultrasuoni(US).....	pagina 14
1.3.3 Stampa 3D.....	pagina 15
1.3.3.1 Origini.....	pagina 15
1.3.3.2 Importanza della stampa 3D.....	pagina 15
1.3.3.3 Prime applicazioni nel Bioprinting.....	pagina 15
Capitolo 2: Bioinks.....	pagina 16
2.1 Introduzione ai bioinks.....	pagina 16
2.2 Biomateriali per bioinks.....	pagina 16
2.2.1 Cos'è un biomateriale.....	pagina 17
2.2.2 Classificazione dei biomateriali.....	pagina 17
2.2.2.1 Effetti prodotti sul materiale: biostabilità e biodegradabilità.....	pagina 18
2.2.2.2 Effetti prodotti sull'organismo: biotossicità, bioinerzia, bioattività,biorisorbibilità.....	pagina 18
2.3 Considerazioni generali sui bioinks.....	pagina 19
2.3.1 Bioinks strutturali.....	pagina 19

2.3.2	Bioinks sacrificabili o fuggitivi.....	pagina 19
2.3.3	Bioinks di supporto.....	pagina 20
2.3.4	Bioinks funzionali.....	pagina 20
2.3.5	Bioinks naturali, sintetici, ibridi.....	pagina 20
2.3.5.1	Biopolimeri naturali.....	pagina 21
2.3.5.2	Biopolimeri sintetici.....	pagina 21
2.4	Formulazioni dei bioinks.....	pagina 21
2.4.1	Cos'è un hydrogel?.....	pagina 21
2.4.2	Proprietà bioinks.....	pagina 22
2.5	Panoramica sui bioinks attualmente in commercio.....	pagina 23
2.5.1	Serie alginato-cellulosa(CELLINK).....	pagina 23
2.5.2	Serie GelMA e GelX.....	pagina 24
Capitolo 3: Tecniche di 3D Bioprinting.....		pagina 26
3.1	Bioprinting ink-jet based.....	pagina 26
3.1.1	Metodologia a getto continuo e su richiesta.....	pagina 27
3.1.2	Approccio termico e piezoelettrico.....	pagina 27
3.1.2.1	Approccio termico.....	pagina 28
3.1.2.2	Approccio piezoelettrico.....	pagina 28
3.1.3	Vantaggi e svantaggi dell'ink-jet based.....	pagina 28
3.1.3.1	CIJ vs DOD.....	pagina 28
3.1.3.2	Attuatore termico vs piezoelettrico.....	pagina 29
3.2	Bioprinting basato su estrusione(micro-estrazione).....	pagina 29
3.2.1	Componenti principali della bioprinter.....	pagina 30
3.2.1.1	Substrato di stampa.....	pagina 30
3.2.1.2	Ugello.....	pagina 30
3.2.1.3	Serbatoio bioink.....	pagina 30
3.2.1.4	Sistemi cartesiani e sistemi delta.....	pagina 30
3.2.1.5	Meccanismi di estrusione:pneumatico e meccanico.....	pagina 32
3.2.2	Fattori chiave per micro-estrazione.....	pagina 33
3.2.2.1	Forma e dimensioni dell'ugello.....	pagina 33
3.2.3	Risoluzione di stampa.....	pagina 34
3.3	Tecnologia SLA.....	pagina 34
3.3.1	Metodo di biostampa SLA.....	pagina 35
3.3.2	Sorgente luminosa.....	pagina 35

3.3.3	Bioinks fotocrosslinkabili.....	pagina 35
3.3.4	Procedura operative.....	pagina 35
3.3.5	Vantaggi SLA: modellazione e imaging.....	pagina36
3.3.6	Osservazioni finali.....	pagina 36
3.4	Laser-assisted Bioprinting(LAB).....	pagina 37
3.4.1	Componenti principali.....	pagina 37
3.4.2	Conclusioni.....	pagina 38
3.5	Bioprinting acustico.....	pagina 38
3.5.1	Principio di funzionamento.....	pagina 38
3.5.2	Conclusioni.....	pagina 39
3.6	Bioprinting magnetico(m3DB).....	pagina 39
3.6.1	Metodi m3DB.....	pagina 40
3.6.2	Conclusioni.....	pagina 41
Capitolo 4:	Bioprinting per la rigenerazione tissutale.....	pagina 42
4.1	Introduzione.....	pagina 42
4.2	Tessuto epatico.....	pagina 42
4.3	Caso di studio.....	pagina 43
4.3.1	Materiali e metodi.....	pagina 43
4.3.1.1	Linee cellulari.....	pagina 43
4.3.1.2	Accorgimenti di stampa.....	pagina 43
4.3.1.3	Colture cellulari.....	pagina 44
4.3.1.4	Formulazione hydrogel 3D a base di alginato.....	pagina 45
4.3.2	Conclusioni e risultati.....	pagina 45
4.3.2.1	Vitalità cellulare e pluripotenza.....	pagina 45
4.3.2.2	Valutazione tessuto funzionale hepatocyte-like cells(HLCs).....	pagina 47
Capitolo 5:	Prospetti futuri e conclusioni.....	pagina 52

Abstract

Questo studio esplora l'impiego del Bioprinting 3D nella medicina rigenerativa, concentrandosi sull'analisi e la caratterizzazione dei bioinks e sulle tecniche di stampa utilizzate. L'obiettivo principale è esaminare i vari tipi di bioinks (con particolare attenzione a quelli di derivazione naturale), valutandone le proprietà fisiche, chimiche e biologiche per determinarne l'idoneità all'uso clinico. Vengono inoltre analizzate diverse tecniche di bioprinting, come la biostampa a getto d'inchiostro, la biostampa laser-assistita, la biostampa per estrusione, la biostampa acustica, la biostampa magnetica e la biostampa stereolitografica (SLA) per comprendere come ciascuna metodologia influenzi la precisione e la risoluzione del costruito stampato, e la vitalità cellulare nei tessuti ingegnerizzati. Infine, il lavoro valuta l'applicazione di queste tecnologie nella rigenerazione di tessuti complessi come quello epatico, fornendo una panoramica sulle sfide attuali e sulle prospettive future della medicina rigenerativa attraverso il Bioprinting 3D.

Capitolo 1.

3D Bioprinting: Considerazioni generali

1.1. Origini del 3D Bioprinting

Da lungo tempo, considerata un'idea utopica e confinata nel regno della fantascienza, la fabbricazione di tessuti e organi sta rapidamente trasformandosi in una realtà concreta. Le radici pratiche della biostampa risalgono al lavoro del gruppo di Thomas Boland presso la Clemson University, che nel 2003 creò di fatto la prima biostampante. Questo risultato innovativo fu raggiunto modificando una stampante a getto d'inchiostro commerciale (ink-jet based) per depositare cellule al posto dell'inchiostro. Questo sistema era in grado di modellare un "bioink" composto da una miscela di cellule, mezzo di coltura e siero su un apposito substrato di coltura cellulare [1, 2]. Successivamente, ulteriori miglioramenti sia nel sistema che nella composizione del bioink hanno permesso di depositare cellule all'interno di idrogel biologici più viscosi, facilitando la creazione di strutture tridimensionali [3].

Simultaneamente, presso l'Università del Missouri, Gabor Forgacs sviluppò un approccio alternativo alla biostampa, posizionando singoli sferoidi cellulari in schemi predefiniti [4, 5]. Durante la coltura, questi sferoidi iniziavano a fondersi tra loro, portando alla formazione di tessuti più spessi e complessi. Nel 2007, lo stesso laboratorio di Forgacs fondò la prima azienda di biostampa 3D, Organovo, con l'intento di sviluppare e commercializzare modelli di tessuto per lo screening dei farmaci e la modellazione delle malattie. Un metodo simile fu adottato da Cyfuse in Giappone nel 2011 con il metodo Kenzen, che assemblava strutture tridimensionali utilizzando sferoidi supportati da una matrice di microaghi [6].

Nel 2007, RegenHu fu fondata in Svizzera, specializzandosi in sistemi di biostampa 3D basati su estrusione, noti come Biofactory. Allo stesso modo, EnvisionTec, un'azienda tradizionalmente nota per le stampanti 3D convenzionali, sviluppò il 3D-Biplotter. Mentre EnvisionTec e RegenHu hanno fornito avanzati sistemi di biostampa per i ricercatori, altre aziende come Poietis hanno esplorato metodi alternativi di biostampa, come la deposizione assistita da laser, focalizzandosi sull'ingegneria di tessuti cutanei [7].

Nonostante la disponibilità crescente dei sistemi di biostampa sul mercato dopo il loro sviluppo iniziale, l'alto costo dei sistemi, essenzialmente robotizzati, limitava il loro utilizzo alle grandi aziende farmaceutiche, mentre i ricercatori accademici spesso non potevano permetterseli. Con l'emergere del

movimento "maker", che ha reso disponibili stampanti 3D economiche e facili da usare, i ricercatori hanno iniziato a costruire le proprie biostampanti nei laboratori. Le prime a basso costo erano varianti di sistemi open-source o stampanti commerciali come MakerBot o Ultimaker. I ricercatori hanno dimostrato che sostituendo la testa di filamento riscaldato di una stampante 3D tradizionale con una pompa a siringa o un sistema di estrusione pneumatica, è possibile ottenere risultati comparabili. Questa democratizzazione ha portato alla nascita di una nuova generazione di biostampanti economiche, sviluppate e perfezionate dalla comunità scientifica piuttosto che da un ristretto gruppo di aziende ben finanziate.

Nel contempo, sono emerse nuove aree di ricerca sui biomateriali stampabili, conosciuti come bioinks. Le principali aziende in questo settore includono CELLINK, originaria di Boston (MA, USA), Allevi (precedentemente BioBots) di Philadelphia (PA, USA), e Se3D della Bay Area in California (CA, USA). CELLINK offre biostampanti dotate di teste multiple, come le serie INKREDIBLE e BIOX, che permettono l'uso di diverse modalità di biostampa, inclusa l'estrusione pneumatica, la stampa termoplastica e la stampa a getto d'inchiostro. I sistemi CELLINK sono inoltre equipaggiati con opportuni sistemi di sterilizzazione, che consentono la biostampa in ambienti puliti senza la necessità di una cappa per la biosicurezza. Allevi produce biostampanti come l'Allevi 2, dotato di due testine di stampa pneumatiche riscaldate. Se3D, invece, si dedica al mercato dell'istruzione superiore con modelli come la R3bel mini e la R3bel X, specificamente progettati per la ricerca.

In aggiunta, numerose aziende si sono focalizzate sullo sviluppo di bioinks per biostampanti 3D. Questo fa parte di uno sforzo più ampio per standardizzare i materiali ed i protocolli di biostampa, rendendo possibile lo sviluppo di applicazioni concrete. Aziende come CELLINK, Advanced Biomatrix e Allevi sono tra i principali attori in questo campo. CELLINK e Allevi forniscono bioink in combinazione con i loro sistemi di biostampa, mentre Advanced Biomatrix si concentra esclusivamente sulla creazione di biomateriali. Lo sviluppo dei bioinks è cruciale per il progresso della biostampa, poiché composizioni facilmente stampabili sono essenziali per la produzione di una vasta gamma di tessuti. Questi materiali sono sviluppati in modo da garantirne la riproducibilità e per la definizione dei protocolli di stampa.

1.2. Ingegneria tissutale

1.2.1. Cos'è l'ingegneria tissutale

Prima di addentrarci nel 3D Bioprinting, vale la pena parlare di ingegneria tissutale in quanto la biostampa di cellule trova la sua naturale applicazione nelle sfide di questa disciplina.

L'ingegneria tissutale rappresenta un settore di crescente interesse ed è caratterizzata da una grande interdisciplinarietà: in essa convergono significativi contributi delle scienze di base, della scienza dei biomateriali, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia molecolare e della medicina rigenerativa. L'ingegneria tissutale è stata definita nel 1998 come “una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni”[9].

Tale definizione fa capire chiaramente qual è lo scopo dell'ingegneria tissutale: la produzione di tessuti che possano integrarsi efficacemente col paziente al fine di ripristinare le funzionalità biologiche che sono venute meno.

1.2.2. Produzione di nuovo tessuto (neomorfoinesi)

Premesso che il termine morfogenesi si riferisce al processo che porta, attraverso la specializzazione delle cellule, alla produzione di tessuti e organi, con il termine neomorfoinesi ci riferiamo a quel processo che porta alla formazione di neo-tessuto, ossia tessuto nuovo *in vitro* ed *in vivo*.

Per far sì che il processo di neoformazione, fondamentale per l'ingegneria tissutale, abbia successo bisogna far sì che le cellule coinvolte si trovino in una situazione tale da poter aderire, crescere e proliferare sul supporto che viene loro fornito.

1.2.3. Approccio dell'ingegneria tissutale

I tre pilastri su cui si basa l'ingegneria tissutale, al fine di produrre nuovo tessuto, sono:

- cellule
- materiali di supporto o *scaffold*
- fattori biochimici

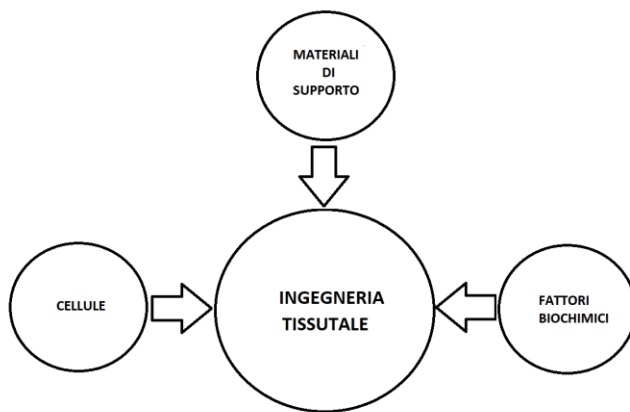


Figura 1. Principali componenti su cui si basa l'ingegneria tissutale al fine di produrre nuovo tessuto.

L'approccio più utilizzato dall'ingegneria tissutale per la formazione di nuovo tessuto è principalmente suddiviso in tre fasi:

- Prelievo o biopsia e coltura cellulare
- semina su *scaffold*
- maturazione

1.2.3.1. Cellule

Ancor prima di avviare una coltura cellulare, bisogna procurarsi le cellule.

Le metodologie per ottenere i vari tipi cellulari dipendono dal tipo di tessuto da cui provengono le cellule e dal loro stato fisico, che può essere classificato in tessuti fluidi (come sangue e linfa) e tessuti duri (come ossa e cartilagini).

Nel caso di tessuti fluidi, si utilizzano metodi come la centrifugazione differenziata per ottenere le varie specie cellulari, nel caso di tessuti duri invece si utilizzano appositi enzimi che ne digeriscono la matrice extra cellulare, lasciando solamente le cellule d'interesse.

Inoltre, in base alla provenienza del materiale cellulare, distinguiamo 3 tipologie di approccio:

- autologo che utilizza le cellule dello stesso paziente
- allogeneico che utilizza cellule della stessa specie ma non dello stesso paziente
- xenogeneico che utilizza cellule animali

Successivamente alla provvigione delle cellule si passa alla loro espansione *in vitro*, per averne un numero sufficiente per la semina successiva su *scaffold*.

1.2.3.2.Semina su *scaffold*

Una volta identificate le cellule da utilizzare, bisogna fornire loro una struttura di supporto che, arricchita con i segnali biochimici specifici, funga da matrice e permetta la crescita di tessuto.

Questa matrice viene chiamata *scaffold*, viene prodotta con biomateriali biorisorbibili, sia di origine naturale che sintetica. Gli *scaffold*, una volta in contatto con l'ambiente biologico, devono andare incontro a progressivo degradamento lasciando così posto al tessuto in fase di formazione. Lo *scaffold* deve avere caratteristiche tali da stimolare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, in modo da favorire prima la rigenerazione e poi l'integrazione del tessuto. Innanzitutto il costruito deve essere biocompatibile, in modo da prevenire il rigetto e limitare la reazione infiammatoria una volta impiantato nel paziente. La cinetica di degradazione dei materiali che compongono lo *scaffold* deve essere strettamente controllata e coordinata rispetto alla formazione di nuovo tessuto *in vivo*: una degradazione troppo rapida non permetterebbe la formazione di un tessuto funzionalmente completo e meccanicamente adeguato a supportare i carichi; al contrario, tempi troppo lunghi ostacolerebbero la formazione di nuovo tessuto. La morfologia ed in particolare la porosità dello *scaffold* sono essenziali: è richiesto un elevato grado di porosità interconnessa per consentire la migrazione e la colonizzazione cellulare e lo scambio di sostanze di nutrimento e di scarto e di gas respiratori.

1.2.3.3.Maturazione

La fase di maturazione rappresenta spesso due fasi del processo di produzione di un tessuto: l'espansione cellulare iniziale e la maturazione finale prima dell'impianto *in vivo*.

Queste due fasi richiedono l'utilizzo di dispositivi denominati "bioreattori". Si tratta di apparati in grado di garantire un ambiente sterile, controllato nella composizione (della fase liquida e gassosa) e nella temperatura, e capace di applicare al costruito in crescita sollecitazioni di ordine chimico, meccanico, idraulico ed elettrico. In tali condizioni le cellule, precedentemente seminate sullo *scaffold*, sono indotte a crescere per formare il nuovo tessuto.

Una volta concluso il condizionamento nel bioreattore, il costruito può essere usato *in vivo* per l'eventuale innesto chirurgico.

In conclusione, l'approccio generico dell'ingegneria tissutale alla medicina rigenerativa prevede il prelievo dal paziente di un frammento di tessuto sano mediante biopsia, l'espansione delle cellule autologhe *in vitro*, la loro semina sullo scaffold ed il condizionamento nel bioreattore.

Nella figura 2 è rappresentata una schematizzazione dell'intero processo, dalla biopsia fino al successivo innesto.

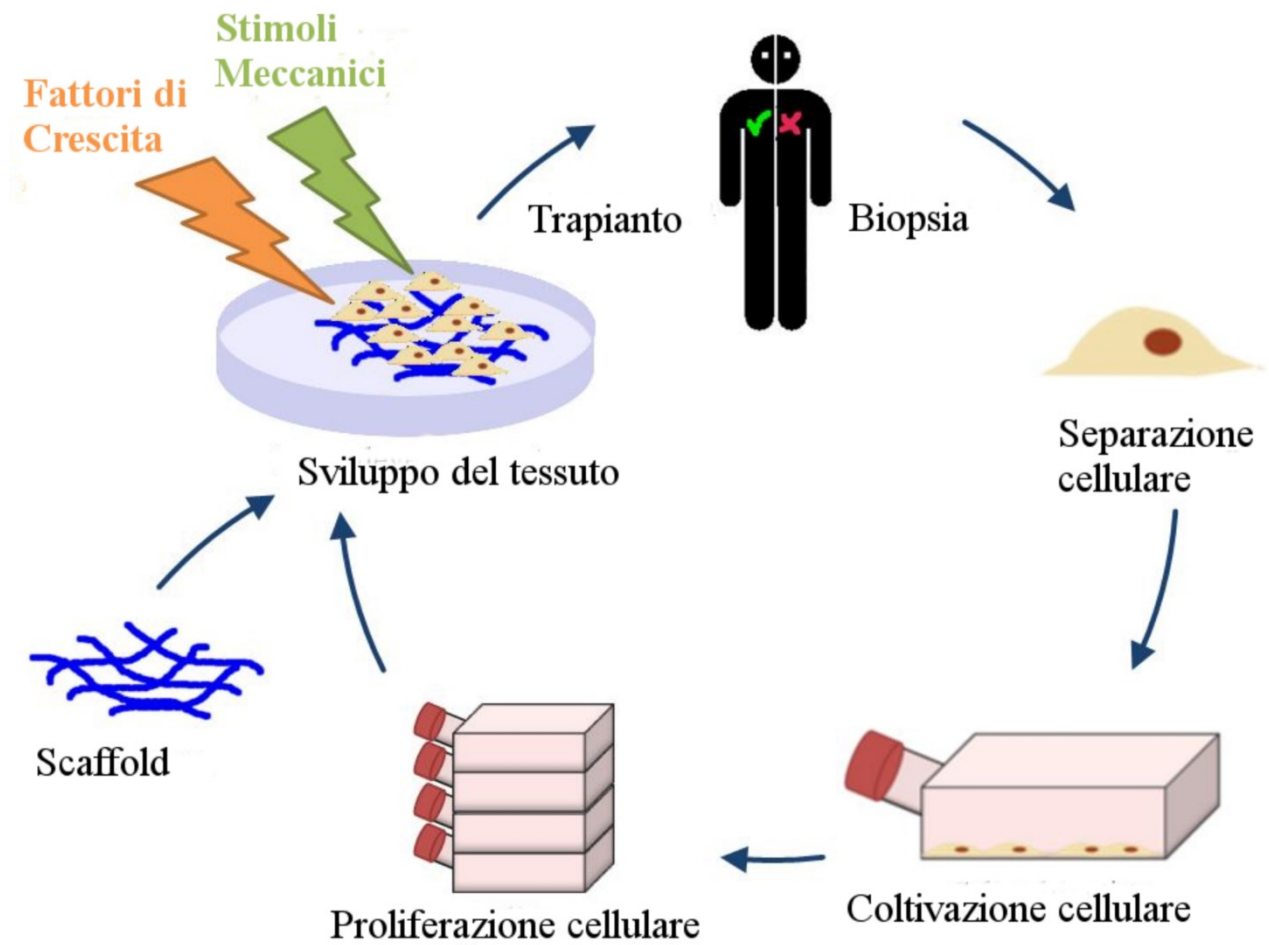


Figura 2. Schematizzazione del processo: Il costrutto ingegnerizzato viene ottenuto prelevando le cellule dal paziente mediante biopsia, espandendole in vitro previa separazione cellulare, seminandole sullo scaffold in condizione prima statiche e poi dinamiche all'interno del bioreattore. Il costrutto viene poi innestato chirurgicamente.

1.3. Fondamenti del 3D Bioprinting

La naturale evoluzione dell'ingegneria tissutale e la necessità di superare i limiti delle colture cellulari bidimensionali, ha portato alla nascita di tecniche più raffinate, in cui le cellule non vengono più coltivate in monostrato bensì su più strati, in modo da produrre una struttura 3D in cui la neomorfogenesi tissutale sia favorita.

Il 3D Bioprinting è una forma di produzione additiva che utilizza un bioink composto da cellule e materiali biocompatibili per l'ingegneria dei tessuti. Utilizzando la progettazione assistita da computer (CAD) per la modellazione 3D dello *scaffold*, potenzialmente basata su scansioni effettuate direttamente su paziente, i bioinks vengono stampati, strato dopo strato, per formare strutture dalle dimensioni e forme desiderate, con le cellule del paziente conservate all'interno del costruito per l'integrazione funzionale, la maturazione e la formazione del tessuto.

A livello schematico possiamo identificare tre fasi che compongono il processo di Bioprinting:

- pre-elaborazione
- elaborazione o stampa effettiva
- post-elaborazione

La fase di pre-elaborazione consiste in realtà in più processi distinti. La progettazione 3D rappresenta di sicuro una sfida non banale in questa fase. L'importanza di creare un modello 3D che simuli il più possibile l'estrema complessità geometrica dei tessuti fisiologici, è indispensabile se si vuole ottenere un costruito biologicamente funzionale.

La fase di elaborazione o stampa effettiva è il momento in cui il materiale biologico viene trattato dal sistema di biostampa e deposto sul substrato ricevente. Perciò rivestono un ruolo fondamentale in questa parte del processo i bioinchiostri utilizzati e le tecnologie di stampa, che devono adeguarsi alle caratteristiche chimico-fisiche del bioink.

La fase di post-elaborazione comprende tutti i processi successivi alla fase di deposizione cellulare: dalla maturazione del costruito in apposito ambiente di coltura, alla valutazione funzionale con relativi test.

Notiamo come le distinte fasi del processo di Bioprinting siano influenzate dalla combinazione di più elementi.

Riassumiamo quindi i principali elementi che coinvolgono il processo di Bioprinting:

- modellazione 3D
- tecnologie di Bioprinting
- bioinks e biomateriali

L'ottimizzazione di ognuno di essi è indispensabile se si vuole ottenere il massimo dal processo di biostampa.

Menzionati i principali protagonisti del processo, vale la pena discutere la fase di pre-elaborazione ed in particolare l'importanza che hanno avuto la modellazione 3D, la stampa 3D e l'imaging biomedicale per le sfide che ogni giorno si presentano davanti al Bioprinting, applicato all'ingegneria tissutale.

1.3.1. Modellazione 3D:CAD/CAM

1.3.1.1.Origini

Le origini delle tecnologie CAD/CAM risalgono agli anni '50 e '60.

Il Dr. Patrick J. Hanratty è spesso accreditato come il padre del CAM [10]. Hanratty, durante il suo periodo alla General Electric, risalente al 1957, sviluppò un software chiamato PRONTO (Program for Numerical Tooling Operations), primo sistema commerciale di programmazione per il Controllo Numerico Computerizzato (CNC o NC) [11]. Il primo software CAD, chiamato Sketchpad (A Man-Machine Graphical Communication System), fu sviluppato durante il suo dottorato al MIT nel 1964 dal Dr. Ivan Sutherland, ampiamente riconosciuto come il padre della grafica computerizzata, [12, 13].

Le innovazioni di Hanratty e Sutherland hanno gettato le basi per l'evoluzione delle tecnologie CAD/CAM, che sono oggi fondamentali in diversi campi, compreso il 3D Bioprinting.

1.3.1.2. Vantaggi CAD/CAM

I principali vantaggi nell'utilizzo della modellazione/progettazione assistita da computer (CAM/CAD) sono la rapidità di progettazione, l'ottimizzazione del design e, soprattutto, le simulazioni virtuali, che forniscono una comprensione approfondita delle prestazioni e del comportamento del prodotto all'interno dell'ambiente simulato. L'integrazione dell'imaging biomedico con la modellazione CAD/CAM si è dimostrata particolarmente importante nel campo del Bioprinting, poiché consente di creare modelli tridimensionali altamente dettagliati e personalizzati basati su scansioni specifiche del paziente, come TC e RM. Questi modelli guidano la progettazione di tessuti e organi bioprintati, che sono perfettamente adattati alla morfologia e alle esigenze funzionali del paziente, nell'ottica di una medicina personalizzata. L'evoluzione di questa tecnologia, come vedremo, si è rivelata di fondamentale importanza sia per la stampa 3D in generale sia per il Bioprinting, migliorando la precisione e l'efficacia dei trattamenti personalizzati.

1.3.2. Imaging biomedico per il Bioprinting

Presentiamo una breve panoramica di come le moderne tecnologie di imaging biomedico trovino diretta applicazione nel campo del Bioprinting, in particolare per una raffinata modellazione 3D che, grazie alle tecniche qui sotto riportate, potrà essere ancora più fedele al tessuto/organo da ricreare tramite ingegneria tessutale.

1.3.2.1. Tomografia assiale computerizzata

La TC è un processo di acquisizione di un gran numero di immagini tomografiche (derivate dal greco antico το'μος tomos, "fetta o sezione") del corpo utilizzando la tecnologia di acquisizione a raggi X bidimensionale [14]. Questo approccio è vantaggioso in termini di alta risoluzione spaziale e tempi di scansione brevi. Tuttavia l'uso di radiazioni ionizzanti, comporta rischi aggiuntivi per il paziente [15]. In alternativa, sempre basata sul principio della TC, troviamo la PET: positrone emission tomography, che differisce dalla TC per l'utilizzo di radioisotopi e si basa sull'emissione, mentre la TC sulla ricezione.

1.3.2.2. Imaging a risonanza magnetica (MRI)

L'MRI utilizza la risonanza magnetica nucleare (NMR) per generare immagini 2D del corpo umano (simili alle scansioni TC). La presenza di un forte campo magnetico può indurre alcuni nuclei atomici ad assorbire ed emettere energia in radio frequenza e ad allinearsi con il campo applicato [16]. Il vantaggio di questo approccio rispetto alla TC è che non utilizza radiazioni ionizzanti e quindi a molte scansioni target sono associati meno rischi per il paziente.

1.3.2.3 Imaging ad ultrasuoni (US)

L'imaging biomedico basato sull'utilizzo delle onde sonore, in particolare degli ultrasuoni (>20Khz), è stato ampiamente utilizzato in diagnostica medica [17]. I vantaggi di questa tecnica rispetto alla TC o alla MRI sono la sua convenienza economica [18], la portabilità [19], oltre al minor rischio per il paziente non essendoci la necessità di radiazioni ionizzanti o l'uso di alti livelli di potenza [20].

1.3.3 Stampa 3D

1.3.3.1. Origini

Nel 1986, Charles Hull sviluppò un metodo per creare oggetti 3D ispirato alla stratificazione della cartapesta, ma in modo più avanzato. Questo processo, chiamato "stereolitografia" (SLA), permetteva di costruire oggetti solidi strato dopo strato, solidificando un materiale liquido mediante l'uso di luce ultravioletta [21]. Questo metodo è ora generalmente noto come manifattura additiva (AM), distinguendosi dai metodi di lavorazione convenzionali che coinvolgono processi sottrattivi [22].

L'idea della AM si è espansa in diverse forme, dalla stereolitografia (SLA) di Hull alla modellazione a deposizione fusa (FDM).

Le applicazioni della stampa 3D, almeno inizialmente, non erano orientate alla creazione di oggetti che dovevano interfacciarsi con l'ambiente biologico.

1.3.3.2. Importanza della stampa 3D

Con l'evoluzione delle tecniche di stampa 3D e dei biomateriali, ha iniziato ad emergere il possibile utilizzo di tale metodologia per applicazioni dirette sul corpo umano con l'utilizzo di materiali inerti.

Un esempio sono le prime pubblicazioni scientifiche riguardanti parti del corpo stampate in 3D (senza cellule) come orecchie [23], mani [24] e protesi per il nuoto [25].

1.3.2.3. Prime applicazioni nel Bioprinting

Una primissima applicazione di stampa 3D orientata al Bioprinting, oltre a quella precedentemente citata di Thomas Boland, presentata in un articolo di Science, pubblicato nel 1993 da Langer e Vacanti, nel quale viene descritta per la prima volta la caratterizzazione e l'applicazione di impalcature 3D biodegradabili [9].

L'evoluzione nel campo dei materiali, l'adozione di tecniche di stampa 3D e di modellazione 3D sempre più raffinate, ha permesso notevoli passi avanti in questo settore.

In particolare la stampa 3D e lo sviluppo di modelli, ha permesso la creazione di scaffold con alto controllo geometrico, garantendo così un ottimo controllo in termini di porosità e interconnessione dei pori [26], caratteristiche fondamentali nel processo di formazione di un tessuto.

Capitolo 2.

BioInks

2.1 Introduzione ai bioinks

Quando ci riferiamo a bioink o bioinchiostro stiamo parlando dell'apposita soluzione che viene dispensata dai sistemi di Bioprinting.

Una possibile definizione di bioink è la seguente: i bioinks sono materiali utilizzati nella biostampa 3D che consistono in una sospensione di biomateriali e cellule viventi progettati per supportare e promuovere la crescita e l'organizzazione delle cellule in strutture tridimensionali. Questi inchiostri devono essere progettati in maniera tale da essere altamente biocompatibili, facilmente trattabili dal sistema di stampa e favorevoli al corretto sostenimento cellulare. Di conseguenza, per soddisfare tali caratteristiche, essi devono essere formati da una matrice costituita da biomateriali naturali o sintetici e fattori di crescita per imitare l'ambiente naturale dei tessuti e favorire la rigenerazione o la creazione di tessuti ingegnerizzati.

In questa sezione verrà proposta una classificazione dei bioinks in base alla loro funzione e natura chimico/fisica.

Oltre che ad una suddivisione funzionale verrà descritta una caratterizzazione dei bioinks: proprietà reologiche, biocompatibilità, capacità di gelificazione, proprietà meccaniche, cinetica di degradazione, stampabilità, capacità di sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare: tutti fattori essenziali ai fini della biostampa. Vedremo l'importanza di queste proprietà e come differenti composizioni e formulazioni di bioinks si prestino meglio per certe applicazioni di bioprinting piuttosto che altre.

2.2. Biomateriali per bioinks

Rispetto alla definizione sopra riportata, in letteratura scientifica i termini bioink e biomaterial bioink sono utilizzati in maniera intercambiabile. Va specificato che la componente cellulare viene chiamata bioink se stampata in 3D su o all'interno di una matrice; mentre con il termine biomaterial bioink ci si riferisce alle formulazioni polimeriche acquose che possono contenere fattori biologici e essere successivamente utilizzati per la semina cellulare o studi *in vivo*. [27]

L'importanza dei biomateriali per i bioinks ormai è chiara: fornire una struttura di supporto cellulare che garantisca un corretto sostegno biologico e meccanico in fase di stampa e di maturazione.

2.2.1. Cos'è un biomateriale

Ad oggi è accettata una definizione di carattere operativo e funzionale che indica come biomateriali “i materiali sintetici progettati per un uso prolungato a contatto con mezzi biologici, minimizzando le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo”. Va specificato che, nella pratica corrente, vengono ormai comunemente inclusi tra i biomateriali anche i materiali di derivazione biologica, che sono fondamentali nella formulazione dei bioinks.

2.2.2. Classificazione dei biomateriali

Una classificazione del tutto generale dei biomateriali basata sulla diversa natura chimica è riportata in figura 3. Si distinguono i materiali metallici, ulteriormente suddivisi in ferrosi e non ferrosi, dai materiali non metallici; questi ultimi vengono poi distinti in organici ed inorganici: tra i primi rivestono grande interesse i polimeri, tra i secondi le ceramiche ed i vetri.

Un'altra classificazione molto importante riguarda in modo più specifico i biomateriali e tiene conto degli effetti prodotti dall'ambiente biologico sul materiale, degli effetti prodotti dal materiale sui tessuti che lo circondano ed, infine, della natura chimica del biomateriale.

È fondamentale ricordare che l'interazione dei biomateriali con l'ambiente biologico, in particolare con un organismo, è un processo biunivoco: ogni materiale esposto in ambiente biologico, quindi *in vivo*, provoca una reazione avversa da parte dell'organismo e, allo stesso tempo, ne subisce un attacco.

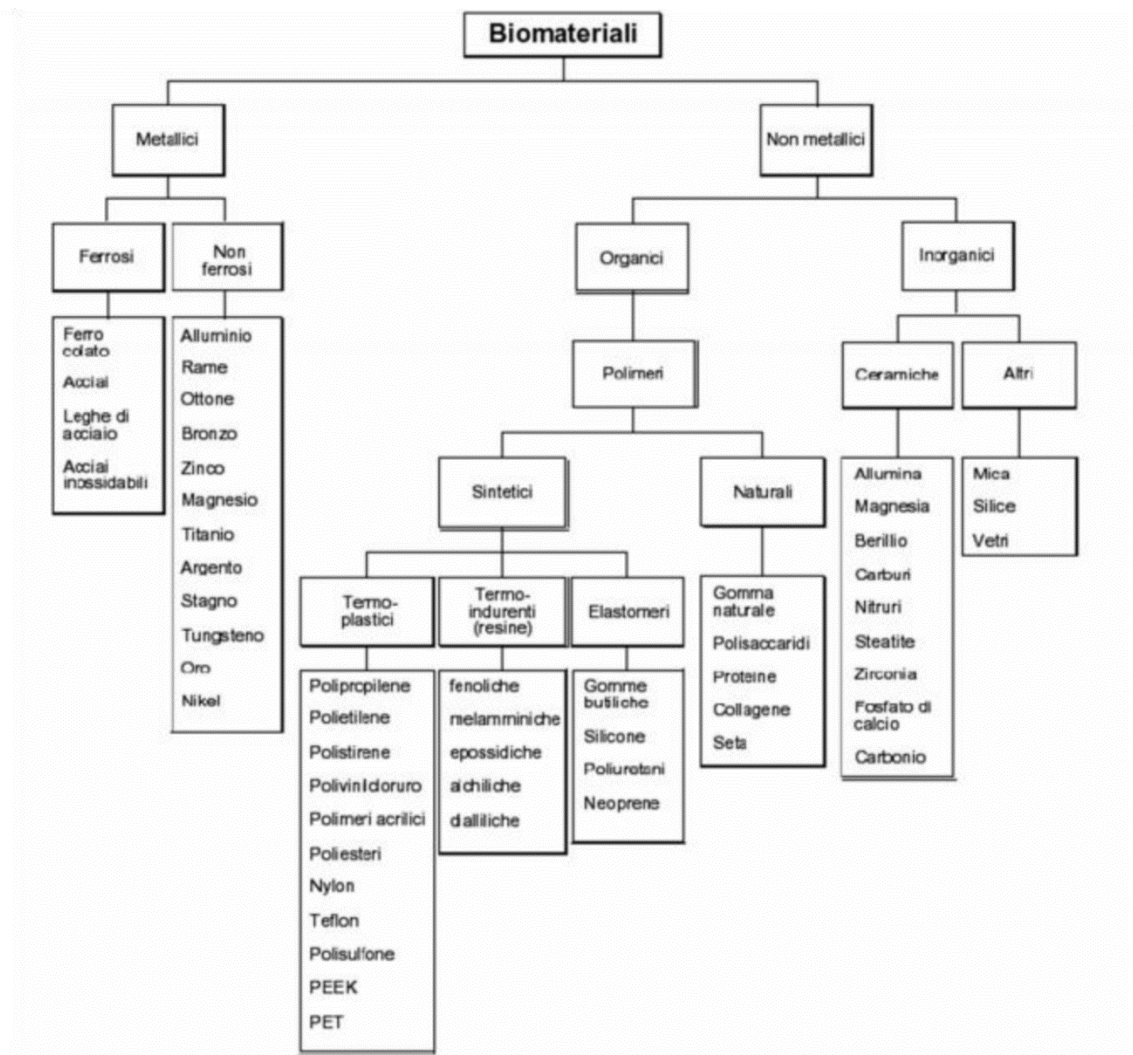


Figura 3. Classificazione generale dei biomateriali.

2.2.2.1. Effetti prodotti sul materiale: Biostabilità e Biodegradabilità

In base agli effetti prodotti dall'ambiente biologico, il materiale può essere definito biostabile o biodegradabile. Un materiale è biostabile quando non subisce significative trasformazioni fisiche e/o chimiche quando posto al contatto con l'ambiente biologico; al contrario, è biodegradabile quando subisce significative trasformazioni fisiche e/o chimiche quando inserito nell'organismo.

2.2.2.2. Effetti prodotti sull'organismo: Biotossicità, bioinerzia, bioattività e biorisorbibilità

In base agli effetti prodotti sull'organismo è possibile distinguere i materiali in: biotossici, bioinerti, bioattivi e biorisorbibili.

I materiali biotossici provocano una reazione indesiderata da parte del tessuto biologico, soprattutto in conseguenza a processi di tipo chimico.

I materiali bioinerti, invece, sono in grado di convivere con l'ambiente biologico senza causare particolari reazioni avverse. È bene precisare che per quanto un materiale possa essere considerato bioinerte, nessuno lo è completamente in quanto ci sarà sempre una minima reazione da parte dell'organismo.

I materiali bioattivi invece inducono una specifica attività biologica: essi permettono la formazione di legami ed interazioni dirette con il tessuto biologico, al quale è consentita la crescita sulla superficie del materiale.

Infine, i materiali biorassorbibili sono quelli che all'interno del sistema biologico subiscono una progressiva degradazione, senza che questa provochi reazioni indesiderate o effetti tossici. Ovviamente un materiale per essere considerato biorassorbibile deve essere allo stesso tempo biodegradabile.

2.3. Considerazioni generali sui bioinks

In questa sezione presentiamo una classificazione funzionale dei bioinchiostri. La funzionalità dei bioinks è definita dalla loro composizione chimica, dalla biocompatibilità, dalla capacità di supportare la crescita cellulare, dalla stampabilità e dalla degradabilità. In generale, i bioinks sono classificati in base a come interagiscono con le cellule ed i tessuti, come si comportano durante il processo di stampa, e come si adattano a specifiche applicazioni cliniche e di ricerca.

2.3.1. Bioinks strutturali

I bioinks strutturali sono una classe di bioinchiostri progettati per fornire supporto meccanico e integrità strutturale durante e dopo il processo di biostampa 3D. Devono mantenere una stabilità fisica sufficiente per creare strutture tridimensionali in grado di supportare il carico meccanico. Questi bioinks, imitando la matrice cellulare, forniscono un ambiente adeguato all'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

2.3.2. Bioinks scarificabili o fuggitivi

I bioinks fuggitivi (o alternativamente sacrificabili) sono una classe di bioinchiostri progettati per creare strutture temporanee o *scaffold* di supporto che possono essere successivamente rimosse o dissolte senza danneggiare le cellule o il tessuto stampato circostante. Questi bioinks vengono

utilizzati per supportare la stampa di strutture complesse, specialmente quando si devono creare canali vuoti, reti vascolari, o cavità interne nei costrutti biostampati.

2.3.3. Bioinks di supporto

I bioinks di supporto sono una categoria di bioinchiostri formata da materiale non biologico, utilizzati per fornire supporto meccanico e strutturale durante il processo di biostampa 3D, ma non hanno una funzione biologica diretta, come la promozione della crescita cellulare o la rigenerazione dei tessuti. Questi bioinchiostri sono progettati principalmente per le loro proprietà fisiche e meccaniche, e vengono spesso utilizzate in combinazione con bioinks biologici per creare strutture complesse e stabili.

2.3.4. Bioinks funzionali

I bioinks funzionali sono una classe di bioinchiostri progettati non solo per la stampa di strutture tridimensionali, ma anche per fornire funzionalità biologiche specifiche ai costrutti biostampati. Possono fornire segnali di natura meccanica, biochimica ed elettrica per influenzare il comportamento cellulare post stampa [28].

Più precisamente, la distinzione fatta per i bioinks di supporto e sacrificabili andrebbe rivista, in quanto le due categorie sono da considerarsi per lo più come “biomaterials bioinks”, quindi biomateriali specializzati per la formulazione di bioinchiostri.

2.3.5. Bioinks naturali, sintetici ed ibridi

Inoltre possiamo classificare i bioinchiostri in base all’origine dei biomateriali di base di cui sono costituiti, distinguendo tre classi principali:

- bioinks naturali
- bioinks sintetici
- bioinks ibridi (combinazione naturale e sintetico)

Tutte le tipologie di bioinchiostri trovano applicazione nel bioprinting: i primi per le eccellenti proprietà di biocompatibilità e per la possibile presenza intrinseca di molecole segnale atte a promuovere l’adesione e la proliferazione cellulare, mentre gli inchiostri sintetici possono garantire maggiore solidità al costrutto e migliorarne così le proprietà meccaniche. I bioinchiostri ibridi abbinano le eccellenti proprietà biologiche dei biopolimeri naturali con quelle meccaniche dei polimeri sintetici.

Vedremo come l'utilizzo e l'ottimizzazione di questi biomateriali sia fondamentale se si vuole garantire un ambiente fisiologicamente favorevole per il corretto sviluppo cellulare.

2.3.5.1. Biopolimeri naturali

I biopolimeri più utilizzati per comporre bioinks naturali sono composti generalmente da polisaccaridi e proteine: collagene [29], gelatina [30], agarosio [31], agarosio-chitosano [32], alginato, chitosano, seta[33], fibrina, matrice cellulare decellurizzata [34], acido ialuronico [35], matrigel [36]. Oltre ai polisaccaridi ed alle proteine viene utilizzata anche l'idrossiapatite[37].

2.3.5.2. Biopolimeri sintetici

I polimeri più utilizzati per i bioinks sintetici: polietilenglicole (PEG) [38], poli(ϵ -caprolattone) (PCL) [39], pluronic [40], poliidrossibutirrato (PHB)[41] ed altri.

2.4. Formulazioni dei bioink

2.4.1. Cos'è un *hydrogel*?

Gli *hydrogel*, appartenenti alla classe dei polimeri (molto spesso poliacrilati), non sono altro che particolari soluzioni acquose formate da reti polimeriche altamente idrofile, che permettono così di trattenere grandi quantità di acqua, fino al 90% del loro peso. La struttura degli *hydrogel* coinvolge legami chimici e temporanei (ionici, covalenti, deboli e forti) di polimeri interconnessi per fornire reti interpenetranti (IPNs), miscele o assemblaggi compositi. Un elevato contenuto di acqua assorbibile (~90%), la degradabilità *in vivo*, la somiglianza con l'anatomia naturale, l'affinità per l'ambiente fisiologico ed un'alta porosità interconnessa, rendono gli *hydrogel* adatti per la formulazione di bioinks, trovando così svariate bioapplicazioni [42, 43].

Quando si deve stampare un tessuto mediante Bioprinting, si deve scegliere opportunamente il bioink, perché questo influenza in modo preponderante il risultato finale. Se si volesse stilare una scala gerarchica d'importanza delle variabili di processo del Bioprinting, sicuramente le caratteristiche dei bioinchiostri, contenendo le cellule, stanno al vertice, piuttosto che le tecnologie di stampa, che eventualmente saranno opportunamente adattate in virtù dei bioink stessi.

Una volta selezionato il tessuto *target* bisogna scegliere le cellule necessarie ed i biomateriali adeguati al corretto sostenimento, sia funzionale che meccanico, di quest'ultime; infine si deve ottimizzare la composizione della soluzione *hydrogel*-cellule tessuto-specifica, che rispecchia la definizione di bioink stesso.

2.4.2. Proprietà dei Bioinks

Nella corretta formulazione di un bioink vanno tenuti in considerazione vari aspetti, principalmente legati alle proprietà che deve esibire la soluzione *hydrogel*-cellule, affinché si presti al meglio per il processo di biostampa.

Le proprietà necessarie per la corretta formulazione di un bioink sono le seguenti:

- biostampabilità
- stabilità *in vivo* ed *in vitro*
- modello della ECM
- affinità cellulare

Il soddisfacimento di queste proprietà è essenziale al fine di avere un bioinchiostro che si possa effettivamente prestare per le applicazioni di Bioprinting.

La biostampabilità è direttamente correlata alle proprietà meccaniche e reologiche del bioink, come rigidità e viscosità, le quali sono influenzate dalla composizione del/i biopolimero/i costituente/i l'*hydrogel*. Modulando opportunamente la composizione dell'*hydrogel* e la densità cellulare, si otterranno livelli di viscosità differenti, che influenzano direttamente il sistema di stampaggio. Non tutti i livelli di viscosità sono tecnologicamente gestibili (come nel Capitolo 3), inoltre livelli troppo elevati possono impattare negativamente sulla vitalità cellulare. Un'altra importante caratteristica legata alla natura chimico/fisica dei biomateriali costituenti i bioinks, che impatta sulla stampabilità, è sicuramente il metodo di reticolazione adottato per la gelificazione della struttura stampata. Questa fase risulta anch'essa molto importante in quanto permette alla struttura appena estrusa di reticolare e quindi di assumere un certo grado di solidità. Come vedremo ci sono bioinks che rispondono a stimoli di natura termica, chimica o ottica.

Per stabilità *in vitro* si intende la capacità del bioink di mantenere la sua struttura e forma per il periodo di tempo necessario agli esperimenti di coltura cellulare, ossia, il costrutto stampato non deve degradarsi troppo rapidamente o perdere la sua integrità meccanica.

Per stabilità *in vivo* si intende la capacità del bioink di integrarsi bene con il tessuto ospite a seguito dell'impianto, supportando la crescita cellulare e la formazione di tessuti senza causare risposte infiammatorie significative.

Per affinità cellulare e modello di ECM ci riferiamo al fatto che il bioink deve mimare il più fedelmente possibile le condizioni fisiologiche, in modo da favorire tutti i processi di riparazione/rigenerazione dei tessuti: in questo il miglior modello di emulazione è sicuramente la matrice-extra-cellulare dei tessuti biologici, che presenta la massima affinità cellulare.

Nella prossima sezione forniremo una panoramica sui bioinks più utilizzati in commercio per la realizzazione di vari tessuti *target*, discutendone i principali vantaggi e svantaggi.

2.5. Panoramica sui bioinks attualmente in commercio

Lo sviluppo nel settore dei biomateriali ha permesso di ottenere un certo livello di standardizzazione quando si vuole stampare un costrutto tissutale. Facendo riferimento ai bioinchiostri commerciali e attualmente maggiormente in uso, possiamo trovare formulazioni pronte all'utilizzo e tessuto-specifiche. In tabella 1 troviamo una lista dei bioinchiostri commerciali più utilizzati.

Tabella 1. Bioink attualmente in commercio

CELLINK Series	GelMA Series	GelX Series	A Series
CELLINK Bioink	Bio Conductink	GelXA	CELLINK A
CELLINK BONE	GelMA	GelXA BONE	CELLINK A-RGD
CELLINK FIBRIN	GelMA A	GelXA FIBRIN	
CELLINK LAMININK+	GelMA C	GelXA LAMININK+	Collagen Series
CELLINK LAMININK 111	GelMA HA	GelXA LAMININK 111	Coll 1
CELLINK LAMININK 121	GelMA HIGH	GelXA LAMININK 411	ColMA
CELLINK LAMININK 411		GelXA LAMININK 521	
CELLINK LAMININK 521		GelXA SKIN	
CELLINK RGD		GelXG	
CELLINK SKIN			

Possiamo identificare 4 serie principali di bioinks in virtù dei biomateriali costituenti. Il prefisso indica il biomateriale tramite il quale è realizzata la soluzione *hydrogel*-cellule, mentre il suffisso indica la funzionalizzazione che rende il bioink tessuto-specifico, quindi più adatto ad un tipo cellulare piuttosto che ad un altro.

2.5.1. Serie alginato-cellulosa(CELLINK)

I primi bioinks ad essere stati utilizzati nelle applicazioni di Bioprinting sono quelli riguardanti la serie costituita da *hydrogel* di alginato-nanocellulosa.

Il principale vantaggio nell'utilizzo di questa tipologia sta sicuramente nella stabilità termica, infatti non presentano transizioni di fase a temperatura ambiente, il che li rende particolarmente adatti al processo di biostampa senza particolari esigenze nel controllo della temperatura.

Il principale svantaggio risiede nel meccanismo di reticolazione che bisogna attuare al fine di ottenere un costrutto che abbia una certa solidità. Per far sì che la struttura appena dispensata possa fornire uno stabile supporto fisico e meccanico alle cellule, è necessario che la struttura gelifichi. Nel caso

delle serie alginato-cellulosa l'impulso che dà il via alla polimerizzazione è di natura chimica e consiste nell'introdurre una soluzione di calcio cloruro (CaCl_2) che, tramite opportune interazioni con le catene di alginato, forma una rete 3D gelificata in cui le cellule possono iniziare a proliferare. L'introduzione di una soluzione calcio cloruro è da controllare con particolare attenzione perché può risultare tossica per le cellule. Un secondo svantaggio è legato alle caratteristiche chimico/fisiche della nanocellulosa che introducono motivi di opacità nel costrutto biostampato, abbassando la qualità di un eventuale *imaging* biomedico.

2.5.2. Serie GelMA e GelX

In risposta alle limitazioni viste nella serie di alginato-cellulosa, l'innovazione nel campo dei biomateriali ha spinto i ricercatori a sperimentare nuove formulazioni di biopolimeri al fine di ottenere bioinchiostri con proprietà migliori, sia in termini di meccanismi di polimerizzazione che di trasparenza ottica finale del costrutto. La modificazione di materiali naturali come la gelatina ha permesso di ottenere nuove tipologie di bioinks sintetici in grado di superare le limitazioni della serie precedente.

La serie GelMA è costituita prevalentemente da una matrice di gelatina che ha subito un processo di metacrilazione, ossia l'introduzione di gruppi metacrilici nella catena principale. L'introduzione di questi gruppi modifica le proprietà chimico/fisiche della gelatina stessa permettendone così la polimerizzazione tramite meccanismi diversi da quelli chimici che potrebbero risultare tossici per le cellule. GelMA, in particolare, è ottenuta a partire dalla gelatina di base introducendo un gruppo fotosensibile nella catena principale. L'introduzione di gruppi fotosensibili permette la gelificazione del costrutto tramite brevi impulsi ottici con una lunghezza d'onda variabile che va da circa 400 a 480 nm. Composizioni differenti nella formulazione del bioinchiostro richiedono lunghezze d'onda diverse per far sì che il meccanismo di polimerizzazione possa avvenire al meglio. Inoltre, al fine di preservare la vitalità cellulare, è opportuno utilizzare una bassa intensità del raggio luminoso.

Ovviamente anche la serie GelMA, come quella alginato-nanocellulosa, presenta i suoi limiti. Il principale limite di questa categoria di bioink risiede nell'instabilità termica della gelatina metacrilata che presenta una temperatura di stampa in un range variabile da 22 a 25°, imponendo così in fase di stampa un controllo di temperatura specifico che permetta di stare al di sotto dei 25°. Questo si traduce in una biostampabilità leggermente più complessa da gestire rispetto alla serie precedente.

Un'evoluzione della GelMA è rappresentata dalla serie GelX. Quest'ultima è costituita dalla matrice di gelatina metacrilata a cui è stato aggiunto un componente della gomma naturale: lo xantano. Chiamato anche gomma di xantano, questo polisaccaride naturale ad alto peso molecolare è incorporato nella formulazione dei bioinks per le sue eccellenti proprietà reologiche, in particolare

per il comportamento pseudo-plastico o di shear thinning che conferiscono ai bioinks un'adeguata viscosità a riposo e un'adeguata fluidità in fase di stampa. Questo di fatto ha permesso al bioink GelX di avere ottime proprietà di biostampabilità e quindi maggiore possibilità applicativa rispetto le serie GelMA.

Le altre serie di bioinks sono prevalentemente a base di matrici di collagene che, in termini di modello ECM, non hanno eguali ma risultano estremamente complicati da stampare.

Inoltre troviamo anche bioinks funzionalizzati con l'introduzione di opportune sequenze biochimiche di adesione note come RGD (arginina – glicina – acido aspartico), atte a promuovere una migliore interazione tra biomateriali e cellule, promuovendo così la formazione di nuovo tessuto.

Capitolo 3

Tecnologie di stampa

Le tecnologie di Bioprinting rappresentano una componente essenziale del processo di bioprinting, in quanto consentono la manipolazione precisa delle cellule e la creazione di strutture tridimensionali di costrutti per applicazioni biologiche. Ognuna di queste tecnologie ha specifiche modalità di deposizione e risoluzione, che influiscono sulla vitalità cellulare, sulla precisione del posizionamento delle cellule e sulla stabilità strutturale dei tessuti stampati. Le proprietà del bioink, come la viscosità, la composizione chimica, la compatibilità cellulare e la capacità di gelificazione, determinano quale tecnologia di Bioprinting sia la più adatta per creare un determinato tipo di costrutto con *target* di tessuto specifico. Ad esempio, i bioinks con viscosità elevata possono richiedere metodi per estrusione, mentre i bioinks più fluidi possono essere stampati utilizzando tecnologie a getto d'inchiostro o basate sull'utilizzo di laser per garantire un posizionamento preciso ed una migliore risoluzione.

Le principali tecnologie di Bioprinting sono 6:

- Bioprinting a getto d'inchiostro (*ink-jet based*)
- Bioprinting per estrusione (a pressione)
- laser-assisted-Bioprinting (LAB)
- Bioprinting basato su stereolitografia (SLA)
- Bioprinting acustico
- Bioprinting magnetico

Partiamo ora con l'analisi della prima tecnologia emersa per il Bioprinting.

3.1. Bioprinting *Ink-jet based*

Il Bioprinting *ink-jet* è la tecnologia di stampa più conosciuta, derivata dall'adattamento delle tradizionali stampanti 2D. Il processo di Bioprinting di tipo *ink-jet* consiste nel preciso posizionamento di gocce di bioink (volume dell'ordine dei picolitri 1–100 pL) su un substrato (biopaper), sotto controllo computerizzato [44]. La deposizione della soluzione avviene senza che vi sia contatto tra testina di stampa e biopaper, perciò questa tecnologia di bioprinting è denominata “senza contatto”.

3.1.1. Metodologia a getto continuo e su richiesta

Le gocce di bioink possono essere dispensate mediante due tecnologie differenti:

- stampa a getto continuo (CIJ *continuous ink-jet* bioprinting)
- stampa su richiesta (DOD *drop-on-demand*)

La stampa CIJ è una tecnologia di scrittura che sfrutta il flusso continuo di bioink per formare le gocce.

A mano a mano che la soluzione scorre attraverso l'ugello, si verifica un fenomeno chiamato instabilità di Rayleigh-Plateau. Questo fenomeno naturale fa sì che il flusso di bioink, che è inizialmente continuo, diventi instabile a causa di fluttuazioni di pressione e velocità di flusso, portando così alla formazione di gocce distinte. Inoltre, quest'ultime appena dispensate dovranno essere elettricamente cariche per poter essere guidate mediante campi elettrici o magnetici in posizioni prestabilite.

La tecnologia DOD si distingue per il suo approccio "a richiesta" nella produzione di gocce di inchiostro. Invece di mantenere un flusso continuo di inchiostro come nel metodo CIJ, il sistema DOD crea e deposita la soluzione solo quando è necessario, in risposta a comandi specifici; questi comandi possono essere di natura differente: termica e piezoelettrica.

3.1.2. Approccio termico e piezoelettrico

Per la formazione delle gocce di bioink, le biostampanti *ink-jet based* possono utilizzare due approcci differenti:

- termico
- piezoelettrico

In figura 4 viene riportata una schematizzazione delle due tipologie di attuatori:

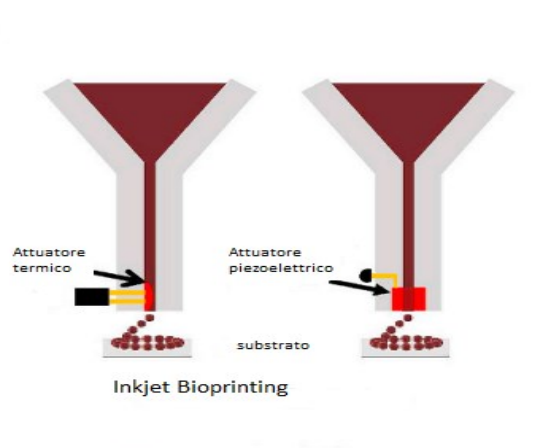


Figura 4. Schematizzazione delle due tipologie di attuatori della stampante a getto d'inchiostro: (i) attuttore termico e (ii) attuttore piezoelettrico.

3.1.2.1. Approccio termico

Una biostampante a getto d'inchiostro termica è composta da una camera di inchiostro con un ugello ed un elemento riscaldante (una resistenza a film sottile) [45]. Per generare una goccia, viene applicato un breve impulso elettrico alla resistenza, che genera calore e forma una piccola bolla di vapore. La bolla si espande o collassa quando il calore viene rimosso. Queste forze di espansione e collasso spingono le gocce di inchiostro di vari volumi fuori dall'orifizio dell'ugello [46–49]. Pertanto, le biostampanti *ink-jet based* termiche sono anche chiamate “biostampanti *bubble jet*”.

3.1.2.2. Approccio piezoelettrico

Una biostampante *ink-jet based* con questa tipologia di approccio utilizza un particolare tipo di materiale: i cristalli piezoelettrici.

Questi ultimi vengono collocati all'interno della camera di inchiostro della stampante, che possiedono la capacità di deformarsi in risposta a una tensione elettrica applicata. Quando viene applicata una tensione, questi subiscono una deformazione meccanica che genera un impulso di pressione all'interno della camera di inchiostro. Questo impulso di pressione forza il bioinchiostro a fuoriuscire dall'ugello, formando così una goccia. La dimensione e la velocità della goccia possono essere regolate modificando l'intensità e la durata della tensione applicata ai cristalli piezoelettrici.

3.1.3. Vantaggi e svantaggi dell'*ink-jet based*

3.1.3.1. CIJ vs DOD

Possiamo definire la tecnologia *ink-jet based* come una tecnologia ad alta risoluzione, essendo in grado di dispensare gocce di bioink con diametri dell'ordine dei micro metri.

Nello specifico, la tecnologia CIJ dispensa gocce di bioink con diametri che spaziano in un range variabile compreso tra 10-150 μm , mentre quella DOD produce gocce di diametro generalmente inferiore di 30 μm .

Il principale vantaggio della tecnica CIJ è sicuramente la velocità di deposizione del bioink, essendo una modalità continua è molto più veloce rispetto alla controparte “su richiesta”, risultando preferibile per la sua velocità piuttosto che per la sua risoluzione.

Lo svantaggio principale della tecnologia CIJ è l'utilizzo di bioinks conduttivi che aumentano il rischio di contaminazione e ne limita l'utilizzo in ambito biomedico. Inoltre lo “spreco” di bioink risulta maggiore rispetto alla tecnologia DOD. Quest'ultima di fatto risulta più adatta nelle applicazioni in cui è richiesto un elevato controllo spaziale in fase di deposizione del bioink, in modo da poter dispensare le gocce quando e dove si vuole.

3.1.3.2. Attuatore termico vs piezoelettrico

In termini di semplicità e costi sicuramente l'approccio termico è più conveniente ed accessibile. L'utilizzo di un film resistivo è più semplice rispetto alla generazione di onde meccaniche tramite cristalli piezoelettrici.

Tra le due tecnologie quella che ha riscontrato un maggior successo in termini di vitalità cellulare delle gocce depositate contenenti le cellule è quella che utilizza l'approccio termico. La breve esposizione a temperature elevate (anche 300°C) per 2 μ s non impatta in maniera significativa sulla vitalità cellulare [50-54].

Nell'approccio piezoelettrico invece l'alta frequenza delle vibrazioni può impattare negativamente sull'integrità, in particolare sull'*unfolding* delle strutture proteiche [55].

3.2. Bioprinting basato su estrusione (micro-estrusione)

La stampa per estrusione è una forma di fabbricazione 3D in cui una o più sostanze vengono forzate attraverso un orifizio, per formare un lungo filo che può essere posato in schemi specifici. L'altezza viene aggiunta al design impilando più strati di questi filamenti. La stampa per estrusione può avvenire tramite due approcci specifici: uno pneumatico ed uno meccanico. L'approccio pneumatico prevede che le sostanze da dispensare siano guidate attraverso l'ugello dalla pressione dell'aria, mentre nell'approccio meccanico le sostanze vengono guidate dalla pressione di un pistone o di una vite.

Nel caso in cui le sostanze vengano estruse attraverso ugelli di dimensioni inferiori a 1 mm, come nel caso del bioprinting, si parla di "micro-estrusione".

A differenza di altri tipi di produzione rapida, come la stereolitografia, la stampa per estrusione ha la capacità di posizionare rapidamente e accuratamente più materiali all'interno di un singolo costrutto. Sebbene anche altre tecnologie di bioprinting siano in grado di manipolare più bioinks (LAB o SLA) simultaneamente, la tecnologia per estrusione risulta favorita in quanto più veloce, e quindi più adatta nella costruzione di costrutti di grande dimensione, dove i lunghi tempi di stampa possono impattare in modo negativo sulla vitalità cellulare.

Sebbene le stampanti a micro-estrusione abbiano molti vantaggi e promettano di creare costrutti clinicamente rilevanti in futuro, vi è ancora un ampio margine di miglioramento. La capacità di stampare più materiali è controbilanciata dal fatto che ogni materiale deve essere accuratamente messo a punto e devono essere determinati i parametri di stampa, inclusi dimensione/forma dell'ugello appropriata, pressione/temperatura di stampa e velocità della testa di estrusione.

3.2.1. Componenti principali della Bioprinter

Le Biostampanti a micro-estruzione hanno una serie di componenti essenziali: un piano di stampa (substrato), un set di assi mobili, un orifizio di estrusione (ugello), un meccanismo di estrusione ed un serbatoio del materiale.

3.2.1.1. Substrato di stampa

Partiamo con il substrato di stampa: è importante scegliere un materiale che consenta di mantenere la coltura cellulare anche dopo che la stampa è stata completata. Pertanto, spesso vengono selezionate piastre Petri o vetrini da microscopio.

3.2.1.2. Ugello

L'orifizio di estrusione è più tipicamente indicato come ugello. La scelta di un ugello appropriato ha un grande impatto sulla risoluzione finale di una biostampa. La scelta di quest'ultimo di fatto è un processo fondamentale perché influenza e viene influenzato da vari fattori che discuteremo in seguito.

3.2.1.3. Serbatoio bioink

Il serbatoio del materiale è la camera dove viene tenuto il bioinchiostro prima di essere estruso attraverso l'ugello. Nelle biostampanti a estrusione, i serbatoi sono siringhe con l'ugello attaccato all'estremità. Queste siringhe sono realizzate in materiale biocompatibile per poter entrare a contatto con materiale biologico. I sistemi di oggi consentono un controllo indipendente dell'ambiente per ciascuna siringa. Apparati di riscaldamento e raffreddamento sono venduti per mantenere una siringa ed il suo contenuto a una temperatura specifica. Questo è vitale per garantire che i materiali siano mantenuti a una viscosità estrudibile e per mantenere le condizioni ottimali per la vitalità cellulare.

L'ultima componente principale è il sistema di assi mobili.

3.2.1.4. Sistemi cartesiani e sistemi delta

Esistono diversi tipi di configurazioni degli assi cartesiani utilizzati sia nelle biostampanti fatte a mano, che in quelle commerciali. La più tipica è un sistema a tre assi che presenta motori passo-passo che consentono il movimento indipendente nelle direzioni x , y e z . Questo sistema consente alla testa di stampa di muoversi liberamente nel piano xy , mentre l'asse z può essere regolato per esplorare diverse altezze in due modi differenti. Il primo modo consiste nel muovere lungo l'asse z la testa di stampa, la piastra di stampa o alternativamente una combinazione delle due (ad esempio, spostando la piastra di stampa nel piano xy mentre l'ugello viene spostato lungo l'asse z). Le stampanti con

questo tipo di movimenti indipendenti nelle 3 direzioni spaziali, vengono definiti “sistemi cartesiani” e sono il tipo di sistema attualmente più utilizzato nel Bioprinting (figura 5).

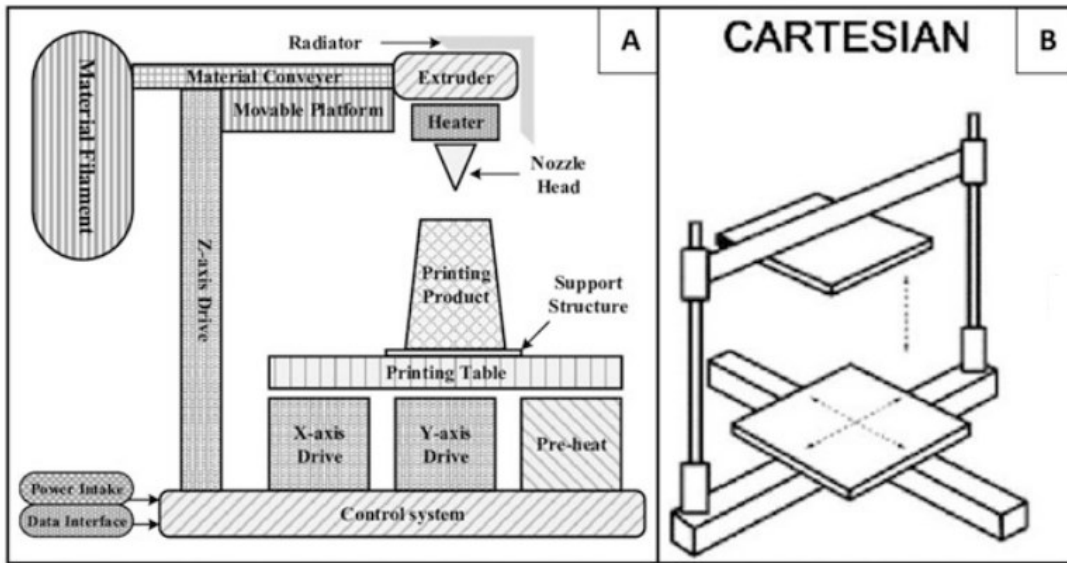


Figura 5. Schema dettagliato di una stampante con sistema di movimentazione cartesiana (a) e movimentazione indipendente degli assi xy-z (b).[56,57]

Il secondo metodo consiste nella sola movimentazione della testina di stampa in relazione all’altezza e gli angoli che ogni braccio articolare ha con il piano di stampa. I sistemi che utilizzano questo tipo di movimentazione vengono chiamati sistemi “delta”(figura 6).

DELTA

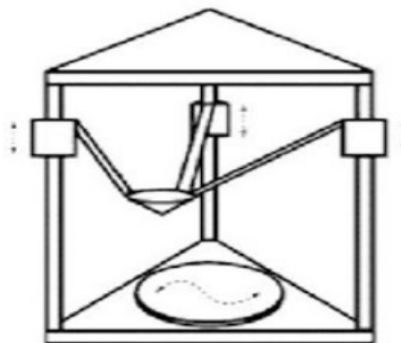


Figura 6. Schematizzazione dei movimenti di un sistema di stampa delta.[58]

Le limitazioni osservate con le stampanti cartesiane hanno spinto i ricercatori a sviluppare stampanti con un numero maggiore di assi. Diversi gruppi hanno presentato stampanti con cinque assi, in cui l'inclinazione e la rotazione possono essere controllate insieme alla traslazione nelle coordinate xyz. Inoltre sono state sviluppate anche stampanti con sei assi, combinando due sistemi a tre assi (uno applicato alla testa di stampa, l'altro al piano di stampa) o utilizzando bracci robotici a sei assi.

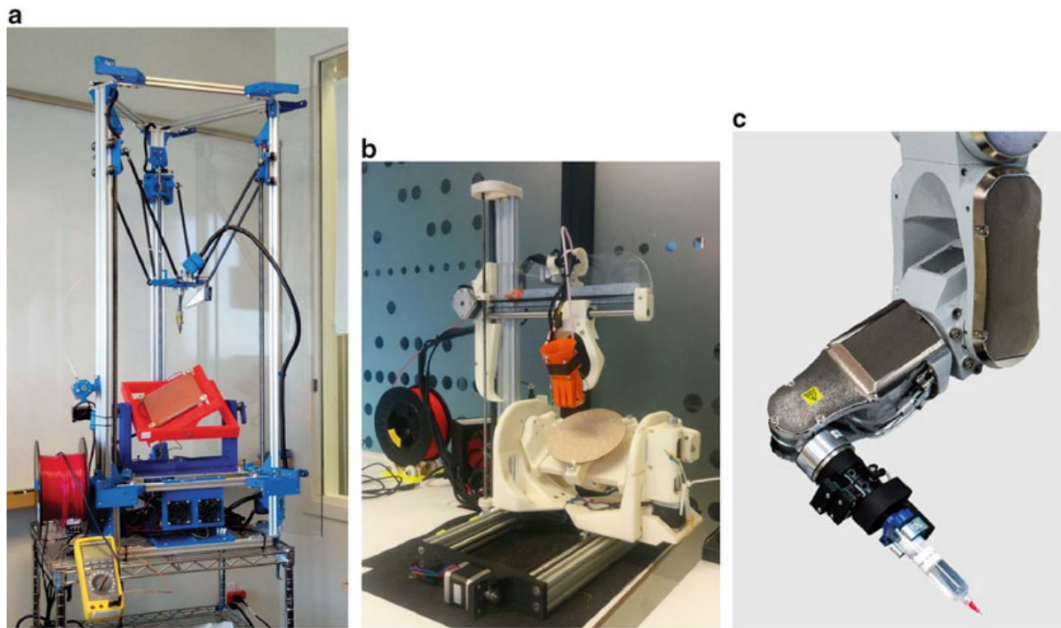


Figura 7. Esempi di stampanti con numeri di assi incrementato: (a) sistema delta a 5 assi; (b) sistema cartesiano a 5 assi; (c) sistema robotico a 6 assi.[59-61]

3.2.1.5. Meccanismi di estrusione: pneumatico e meccanico

Le Bioprinter per estrusione sfruttano due meccanismi differenti per il dispensamento del bioink: pneumatico e meccanico (figura 8). Entrambi gli approcci risultano in una pressione continua applicata al bioink.

Quelle basate su meccanismo pneumatico utilizzano un gas compresso per forzare l'uscita del bioinchiostro da una siringa-serbatoio durante la stampa. Queste configurazioni hanno componenti relativamente semplici che consentono loro di dispensare i materiali con un'ampia gamma di pressioni [62]. La capacità di utilizzare alte pressioni con questi sistemi, consente ai ricercatori di stampare materiali anche altamente viscosi. Ciò include non solo i bioinchiostri, ma anche polimeri fusi che possono essere utilizzati come supporto strutturale nei progetti biostampati.

Le Bioprinter basate su sistemi meccanici utilizzano la forza pressoria generata da un pistone o da una vite per spingere il bioink fuori dall'ugello. Quelle a pistone, utilizzando un movimento meccanico diretto, risultano più adatte a dispensare in maniera precisa il bioink rispetto alla variante a vite, che risulta invece più idonea nel momento in cui si utilizzano soluzioni più viscosi [63, 64].

In linea generale possiamo dire che entrambe le varianti (pneumatica e meccanica) sono utilizzate con successo per il bioprinting. Ovviamente ognuna ha i suoi pro e contro nell'utilizzo specifico con le cellule. I sistemi pneumatici, lavorando su range pressori maggiori, sono in grado di gestire soluzioni ad alta viscosità e quindi maggiormente orientate alla stampa di strutture 3D, per fornire

supporto strutturale (*scaffolds*). Mentre i sistemi meccanici sono più orientati alla stampa di soluzioni contenenti anche le cellule, quindi dei bioinks in generale.

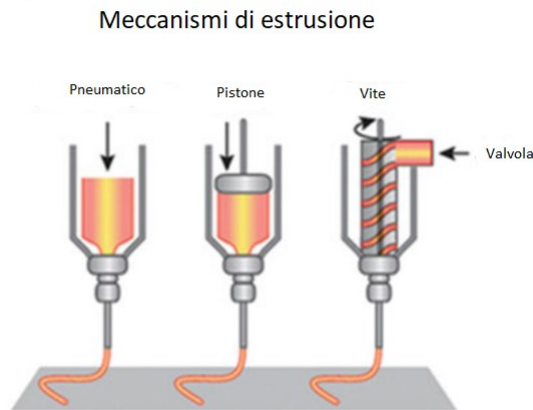


Figura 8. Meccanismi di estrusione: pneumatico(i); meccanico a pistone(ii); meccanico a vite(iii).

3.2.2. Fattore chiave per micro-estrazione

Sebbene esistano numerose configurazioni di stampanti, come discusso in precedenza, l'ugello di stampa è l'unico componente universale in tutti i sistemi, sia *home-made* che commerciali, a pistone o pneumatici. Questo piccolo componente è uno dei più cruciali nella configurazione della biostampante. La scelta dell'ugello comporta effetti significativi sulla tensione di taglio, sulla distribuzione del bioinchiostro e sulle proprietà reologiche del bioinchiostro estruso.

3.2.2.1. Forma e dimensioni dell'ugello

Il primo criterio per la selezione di un ugello è la forma che deve avere. Questa influisce direttamente sulla forma del bioinchiostro quando viene estruso. Oltre a controllare la forma del filamento, la forma dell'ugello gioca un ruolo cruciale nelle tensioni di taglio applicate al bioinchiostro, che hanno effetti significativi sulla vitalità cellulare durante la stampa [65, 66]. In merito a questo in uno studio condotto da Billiet et al., tramite opportuni modelli, è stata valutata l'influenza che potesse avere la forma dell'ugello (conica vs cilindrica) sulla vitalità cellulare. I risultati ottenuti tramite modelli mostrano come il modello conico sia più adatto a mantenere un'alta vitalità cellulare rispetto a quello cilindrico. Questo beneficio va via via perdendosi per pressioni superiori a 300KPa [65].

La dimensione dell'ugello deve essere considerata sia in relazione al diametro che alla lunghezza. Entrambi influenzano le tensioni di taglio subite dal substrato durante l'estrazione e quindi influenzano la vitalità cellulare.

Chang et al. hanno riportato uno studio che discute gli effetti del diametro dell'ugello sulla sopravvivenza cellulare, utilizzando un metodo di stampa cellulare diretta [67]. I risultati hanno mostrato che l'aumento del diametro dell'ugello può portare a forze di taglio più elevate, che riducono il tasso di sopravvivenza cellulare. Invece, quando è la lunghezza ad essere aumentata, il tempo entro cui le cellule rimangono a contatto con l'ugello è aumentato, esponendole a sforzi di tagli più prolungati, riducendo così la vitalità cellulare [68].

3.2.3. Risoluzione di stampa

Nel contesto della biostampa possiamo fare riferimento a due tipi di risoluzione.

Il concetto classico di risoluzione in un processo di stampa basato su estrusione, è riferito alla minima variazione spaziale che il sistema di assi consente alla testina di stampa, ed è dell'ordine di 1 μm .

La risoluzione effettiva della biostampa però dipende da diversi fattori, tra cui la viscosità del materiale, la velocità di flusso del materiale ed il diametro dell'ago. La risoluzione effettiva di biostampa, perciò, è definita come il diametro del filamento estruso, per inchiostri con e senza cellule, e dal posizionamento accurato dei filamenti estrusi. La scelta delle dimensioni appropriate dell'ugello influenzerà significativamente questo parametro e, pertanto, è fondamentale non solo per garantire la vitalità cellulare, ma anche come componente critico nella progettazione e nell'esecuzione di stampe ad alta risoluzione.

3.3. Tecnologia SLA

Passiamo ora all'analisi della prima tecnologia di bioprinting “senza contatto”.

La biostampa SLA è un metodo di stampa diretta assistita dalla luce che utilizza bioink fotosensibili. Questa tecnologia di bioprinting 3D è emersa in risposta alle esigenze nella fabbricazione di grandi *scaffold* per l'ingegneria tissutale. Rispetto ai metodi di biostampa convenzionali, la biostampa 3D SLA offre diversi vantaggi sotto forma di multiscalabilità, alta risoluzione e stampa rapida di impalcature altamente complesse con micro e nano-architetture [69, 70]. La capacità di fabbricare impalcature impiantabili con geometria anatomica accurata, caratteristiche superficiali precise e proprietà fisiche e chimiche regolabili, la rendono altamente rilevante per le applicazioni cliniche.

Vediamo il principale approccio SLA pilotato da luce.

3.3.1. Metodo di biostampa SLA

Il metodo utilizzato nella biostampa SLA prevede la progressiva stratificazione di materiale (*Layer-by-layer*, Lbl) su un piano 2D, affiancato da un simultaneo processo di polimerizzazione UV per far sì che il piano sottostante possa supportare quello soprastante e così via (figura 9).

Il primo elemento chiave nel processo di biostampa SLA è la sorgente luminosa, mentre il secondo elemento è necessariamente l'oggetto investito dal raggio luminoso, ossia il bioink fotocrosslinkabile.

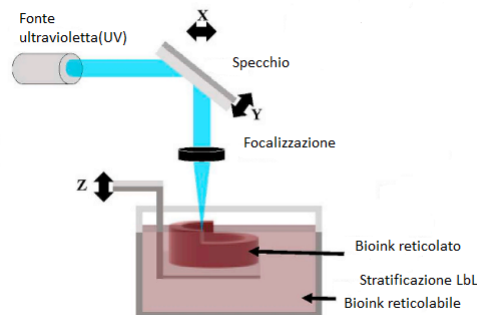


Figura 9. Bioprinting SLA.

3.3.2. Sorgente luminosa

La sorgente di illuminazione è l'elemento chiave per definire le prestazioni del processo SLA.

I sistemi comunemente usati consistono in luce UV o visibile, a seconda del fotoiniziatore selezionato.

La risoluzione e l'accuratezza delle parti stampate sono spesso determinate dalle caratteristiche della sorgente di illuminazione. Inoltre, le proprietà meccaniche dell'impalcatura possono essere regolate anche controllando le condizioni di illuminazione [71].

3.3.3. Bioink fotocrosslinkabili

Per la biostampa SLA, i bioink devono essere fotocrosslinkabili e, pertanto, la soluzione di bioinchiostro deve poter essere reticolata mediante illuminazione UV o visibile. Per fare questo bisogna avere un *hydrogel* costituito da polimeri fotoreticolabili, ossia preventivamente modificati tramite l'aggiunta di opportuni gruppi sensibili agli stimoli ottici. Un esempio è rappresentato dalla classe degli *hydrogel acryloici* o acrilati (es. GelMA).

3.3.4. Procedura operativa

In sintesi, il processo di biostampa 3D SLA inizia con la preparazione di un bioinchiostro adatto. Il bioinchiostro viene preparato mescolando le cellule in una soluzione di prepolimero fotosensibile.

Successivamente, il modello 3D da stampare viene convertito in un insieme di immagini sezionate e fornito come input per il sistema di biostampa. Nei passaggi di fabbricazione, prima il bioinchiostro viene dispensato in una piastra di Petri per ottenere uno spessore del materiale desiderato. In secondo luogo, un'immagine dall'insieme di immagini-sezione relative al costrutto di input viene utilizzata come maschera e proiettata sul bioinchiostro dispensato per avviare la reticolazione. Questi due passaggi di dispensazione del bioinchiostro e proiezione dell'immagine a schema, vengono ripetuti fino a quando tutte le immagini sono state proiettate per costruire un costrutto 3D. Infine, la porzione non reticolata del bioinchiostro viene rimossa per separare l'impalcatura stampata in 3D contenente le cellule incapsulate.

3.3.5. Vantaggi SLA: modellazione e *imaging*

Analogamente al metodo di fabbricazione per estrusione utilizzato nella stampa 3D, la biostampa SLA fabbrica costrutti tessutali 3D in modo strato per strato. A tal fine, il modello 3D progettato viene convertito in un insieme di immagini 2D sezionate. Ogni immagine 2D dell'insieme rappresenta la sezione trasversale del modello solido 3D in un piano specifico a partire dall'alto. Pertanto, l'input per il processo di biostampa 3D SLA è sotto forma di immagini sezionate. Molti metodi di *imaging* biomedico, come la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (MRI), generano immagini tessutali sotto forma di insiemi di immagini. Basandosi su questa somiglianza, i dati di *imaging* biomedico possono essere utilizzati direttamente nella biostampa SLA. Pertanto, la biostampa 3D SLA può essere utilizzata per numerose applicazioni basate su un'ampia gamma di dataset di input: dalle geometrie definite dall'utente a strutture tessutali complesse e fisiologiche.

3.3.6. Osservazioni finali

La biostampa 3D SLA si è affermata come una tecnologia promettente per la rigenerazione di tessuti e organi, grazie alla sua alta flessibilità, risoluzione e rapidità di fabbricazione, che la rendono un'opzione attraente rispetto ai metodi tradizionali. Questa tecnologia, combinata con biomateriali innovativi, ha dimostrato la sua capacità di creare costrutti tessutali complessi e di studiare il comportamento e l'interazione cellulare in ambienti 3D.

Per migliorare ulteriormente la tecnologia SLA, è necessario affrontare alcune limitazioni, come l'uso di diversi bioinchiostri, la prevedibilità e il controllo del processo di reticolazione e la risoluzione. Ulteriori ricerche sono richieste per ottimizzare e perfezionare la tecnologia SLA.

In futuro, si prevede che la biostampa 3D SLA sarà utilizzata per creare scaffold altamente complessi e funzionali, con un comportamento spazio-temporale preciso, rappresentando attualmente un'importante area di ricerca.

3.4. Laser-assisted Bioprinting (LAB)

La stampa laser-assistita è un'innovativa tecnica di stampa “senza contatto”, nata inizialmente per la scrittura diretta di materiali metallici.

La tecnologia LAB applicata al bioprinting è emersa dal lavoro iniziale dei ricercatori del *Naval Research Laboratory* come strumento per ingegnerizzare tessuti artificiali [72].

Grazie alla sua risoluzione di stampa cellulare senza precedenti, è stato utilizzato con successo per la deposizione di materiale cellulare, acidi nucleici e peptidi, utilizzando frequenze di 5Khz [73-76].

Questo metodo di stampa si basa sull'effetto di trasferimento indotto dal laser (LIFT), in cui il materiale d'interesse viene trasferito mediante l'azione di una sorgente elettromagnetica (figura 10)

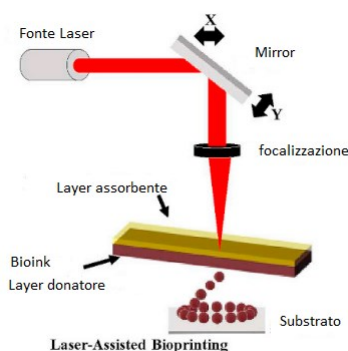


Figura 10. Schematizzazione Bioprinting LAB.

3.4.1. Componenti principali

I sistemi di biostampa basati su tecnologia LAB presentano essenzialmente 3 componenti principali:

- sorgente elettromagnetica
- film donatore o bersaglio
- substrato ricevente

L'idea di base è quella di trasferire il materiale cellulare dal film donatore al substrato ricevente mediante l'azione esercitata dal laser. Per poter trasferire il materiale biologico in questa maniera, viene adottato un particolare assemblaggio nel film donatore. L'assemblaggio prevede l'accoppiamento di tre sottili film di natura diversa: il primo è un film trasparente al raggio laser (es. oro, vetro o quarzo), il secondo è un sottile film metallico che avrà il compito di assorbire l'energia del laser, ed infine il terzo è il film donatore cioè il bioink. La trasparenza del primo film permette al laser di investire il secondo film con un'energia tale da provocare l'evaporazione di piccole molecole di metallo, traducendosi così in un'accurata deposizione di bioink, con una precisione e risoluzione micrometrica [77].

3.4.2. Conclusioni

La tecnologia LAB è sicuramente una delle tecnologie più raffinate nell'ambito del bioprinting con i suoi punti di forza e di debolezza. Rappresenta molti vantaggi in termini di automazione, riproducibilità ed elevata produttività, che la rende adatta alla produzione di costrutti 3D di dimensioni rilevanti. Inoltre un'elevata risoluzione spaziale, dell'ordine dei picolitri, permette tramite il supporto CAD la biostampa di geometrie cellulari altamente definite.

Un altro vantaggio è l'assenza dell'ugello che permette di spaziare tra i vari bioinks utilizzabili stando in un range di viscosità che varia da 1 a 300 mPa e con concentrazioni cellulari di circa 10^8 cellule/mL [78]. Queste caratteristiche rendono la tecnologia molto promettente per lo sviluppo di tessuti eterogeni ad alta densità cellulare.

Gli svantaggi sono sicuramente legati all'aspetto energetico della sorgente laser. Le interazioni cellula-laser e cellula-substrato non sono del tutto prevedibili e potrebbe portare a fenomeni indesiderati in termini di vitalità cellulare [79, 80].

Motivo di sfida sicuramente è rappresentato dalla selezione del biomateriale costituente il bioink (o film donatore). È necessario combinare caratteristiche come rapida cinetica di gelificazione ad una compatibilità delle lunghezze d'onda operative, al fine di preservare risoluzione e organizzazione cellulare all'interno dei costrutti biostampati.

3.5. Bioprinting acustico

Negli ultimi anni, la biostampa 3D ha subito significativi sviluppi grazie all'introduzione di tecnologie avanzate che consentono una manipolazione più precisa delle cellule. Una delle innovazioni più promettenti in questo campo è l'utilizzo della tecnologia delle onde acustiche di superficie, che permette di manipolare e costruire strutture 3D complesse operando a livello di singola cellula [81]. Questo approccio sfrutta le onde sonore per muovere le cellule in diverse direzioni, creando schemi tridimensionali intricati senza la necessità di contatto diretto. A differenza delle tecnologie tradizionali, la biostampa acustica offre vantaggi significativi in termini di precisione, minimizzazione dello stress cellulare e assenza di problemi di intasamento, rendendola una tecnica innovativa e potenzialmente rivoluzionaria.

3.5.1 Principio di funzionamento

Il Bioprinting acustico sfrutta le onde acustiche per movimentare piccolissimi volumi cellulari, dell'ordine dei picolitri. Il processo inizia con la preparazione di un pool aperto di bioinchiostro che contiene le cellule desiderate (vaschetta). Quando viene applicato un modesto campo acustico,

l'espulsore acustico, composto da un substrato piezoelettrico con anelli interdigitati di oro sulla parte superiore, genera onde sonore superficiali su richiesta. Queste onde sonore circolari creano un punto focale acustico all'interfaccia tra aria e fluido. Quando le forze di vibrazione acustica superano la tensione superficiale del bioinchiostro, si formano goccioline acustiche che possono essere controllate e direzionate per creare modelli 3D desiderati. Il diametro delle gocce varia a seconda della frequenza acustica utilizzata, e la velocità di espulsione può raggiungere fino a 10.000 goccioline al secondo.

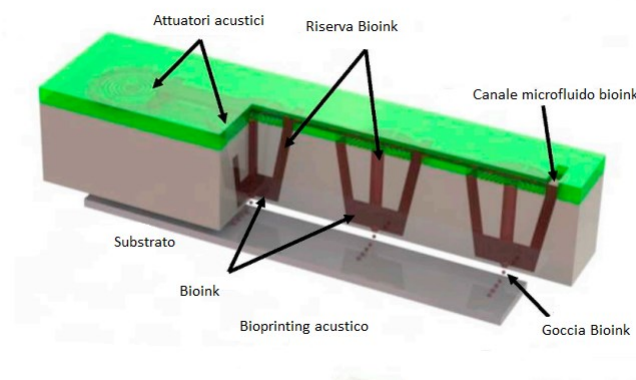


Figura 11. Bioprinting acustico.

3.5.2. Conclusioni

Il bioprinting acustico è sicuramente una tecnica all'avanguardia e, come tutte, presenta dei vantaggi e degli svantaggi. Il fatto di essere una tecnologia “senza contatto” la rende esente dai problemi connessi all'utilizzo di bioinks ad alta viscosità, come l'intasamento dell'ugello. Inoltre protegge le cellule da possibili stress di taglio, calore e pressione che si possono riscontrare facilmente nei sistemi DOD [82]. Questo è confermato dal fatto che con questo sistema di dispensamento sono stati biostampati diversi tipi cellulari: fibroblasti, epatociti, cellule staminali con una vitalità post stampa superiore all'85%.

Le limitazioni attuali di questa tecnologia risiedono fondamentalmente nell'approccio di alto livello di questi sistemi, rendendoli di fatto poco adatti alla simultanea dispensa di più bioink. Questo è un limite cruciale di questa nuova tecnologia che limita fortemente l'eterogeneità che dovrebbero avere i costrutti cellulari biostampati al fine di simulare più fedelmente quelli fisiologici.

3.6. Bioprinting magnetico (m3DB)

Quando parliamo di Bioprinting magnetico ci riferiamo a tutti quei sistemi in grado di creare strutture 3D cellulari sfruttando fenomeni basati sul magnetismo, per indurre la movimentazione delle cellule. Questi sistemi si basano sull'esposizione di cellule magnetizzate a campi magnetici attraverso levitazione, Bioprinting o formazione di anelli, per promuovere l'aggregazione cellulare in strutture

3D (figura 12). Tuttavia, lo sviluppo riuscito di queste strutture dipende da diverse caratteristiche metodologiche e può essere applicato per imitare diversi tessuti umani. In generale, lo sviluppo delle colture m3DB è in aumento, con i sistemi di Bioprinting e levitazione che sono i più utilizzati per generare colture omotipiche o eterotipiche, principalmente per imitare la fisiologia dei tessuti umani, ma anche per effettuare *screening* terapeutici.

3.6.1. Metodi m3DB

La tecnologia basata sul magnetismo consiste nell'incubare le cellule in apparati 2D con nanoparticelle magnetiche (MNP), chiamate NanoShuttle™-PL, composte da una miscela di nanoparticelle di ossido di ferro, oro e poli-L-lisina. Queste MNP si legheranno elettrostaticamente e non specificamente alla membrana cellulare per magnetizzarle. Successivamente, le cellule magnetizzate vengono separate enzimaticamente e trasferite in un apparato 3D, secondo la metodologia descritta per ciascun metodo m3DB. Le cellule vengono quindi esposte a campi magnetici generati da magneti al neodimio per indurle ad aggregarsi in strutture 3D [83].

Attualmente, sono disponibili tre tipi di modelli basati su magnetismo, presentati in figura 12, tutti a partire dalla magnetizzazione delle cellule (Figura 12 A) per creare diverse strutture finali tramite levitazione, bioprinting o formazione di anelli. Il metodo di levitazione m3DB (Figura 12 B) consiste nel seminare le cellule e poi posizionare i magneti sopra le piastre, per promuovere la levitazione delle cellule magnetizzate in un'interfaccia liquido-aria, dove si aggregeranno in strutture 3D attraverso interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare [83, 84]. Il metodo di Bioprinting m3DB (figura 12 C) consiste nel posizionare i magneti sotto le piastre, dove sono state seminate le cellule magnetizzate, per promuovere l'aggregazione cellulare e la formazione della matrice stampando strutture 3D sul fondo di ciascun pozzetto del substrato di stampa.

Il metodo m3DB più recente, la formazione di anelli (figura 12 D), consiste prima nel levitare le cellule magnetizzate per permettere la formazione di aggregati con ECM, seguita da un secondo passo per disintegrare queste colture 3D in cellule disperse e, infine, posizionare queste piastre sopra un'unità magnetica con magneti al neodimio a forma di anello per indurre l'aggregazione cellulare in una forma toroidale [83].

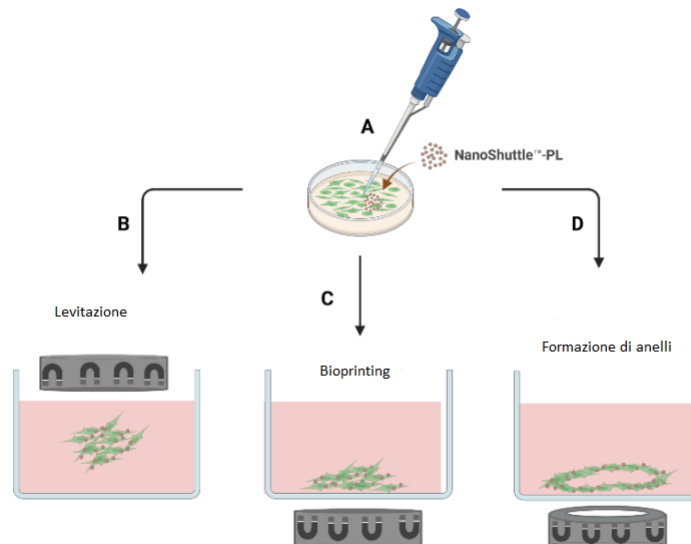


Figura 12. Schematizzazione Bioprinting magnetico: magnetizzazione iniziale delle cellule(A) per formare strutture 3D tramite levitazione(B), Bioprinting(C) o formazione di anelli(D).

3.6.2 Conclusioni

Il Bioprinting magnetico presenta sicuramente dei vantaggi in termini di controllo spaziale [85] ma soprattutto dei vantaggi dal punto di vista biologico, ossia la produzione endogena della matrice extracellulare, il miglioramento delle comunicazioni cellula-cellula e cellula-matrice, essenziali al naturale sviluppo di un ambiente fisiologico.

L'uso delle colture cellulari 3D è cresciuto e si è aggiornato negli ultimi anni. Nonostante il miglioramento delle tecniche per la creazione di strutture 3D, la dimensione, la forma e la morfologia delle strutture 3D sono difficili da controllare.

Inoltre, il rischio di disintegrazione di queste strutture è presentato come una delle principali limitazioni, che si verifica anche con l'uso di superfici a bassa adesione (ULA), e, in particolare, quando si effettuano tante manipolazioni.

In generale l'm3DB è una tecnica promettente perché consente di mimare tessuti fisiologici sani e malati: tessuti di grasso, polmone, valvola aortica, vasi sanguigni e tumori di glioblastoma e mammella sono stati fabbricati con metodi simili; tutti hanno mostrato un'espressione proteica e una ECM simili a quelle riscontrate *in vivo* [86].

Capitolo 4

Bioprinting per ingegneria tissutale

4.1. Introduzione

Il Bioprinting rappresenta una delle frontiere più avanzate della medicina rigenerativa, aprendo nuove possibilità per la creazione di tessuti e organi funzionali capaci di sostituire quelli danneggiati o malati. A differenza delle tradizionali tecniche di coltura cellulare in 2D, che presentano significative limitazioni nel replicare la complessità strutturale e funzionale dei tessuti umani, il Bioprinting permette la fabbricazione tridimensionale (3D) di strutture cellulari complesse con un controllo preciso della disposizione delle cellule, dei biomateriali e dei fattori bioattivi. Questo approccio innovativo supera i limiti delle colture 2D, le quali non riescono a replicare l'ambiente tridimensionale naturale necessario per la crescita e la differenziazione cellulare ottimale, portando a risultati meno efficaci nella rigenerazione tissutale.

In un contesto in cui le moderne tecniche di coltura 2D non sono sufficienti per affrontare le complesse sfide della medicina rigenerativa, il Bioprinting si distingue come una tecnologia rivoluzionaria capace di trasformare la ricerca biomedica e le pratiche cliniche, fornendo soluzioni personalizzate più efficaci per la cura di una vasta gamma di patologie.

In questa sezione viene presentato un caso di studio che si incentra sulla produzione mediante Bioprinting di tessuto epatico. Lo studio condotto dal team di ricerca Faulkner *et al.* ha dimostrato la compatibilità nell'utilizzare una biostampante a valvole ink-jet per trattare cellule molto delicate come le staminali.

4.2. Tessuto epatico

Il fegato è una delle ghiandole più grandi e vitali del corpo umano, essenziale per numerose funzioni, tra cui la detossificazione del sangue, la produzione di bile per la digestione dei grassi, la sintesi di proteine plasmatiche e il metabolismo di carboidrati, grassi e proteine. Sebbene sia uno degli organi che vanta maggiori proprietà rigenerative, le malattie epatiche, come la cirrosi e il carcinoma epatocellulare, possono compromettere gravemente le sue funzioni, portando spesso a insufficienza epatica e bassa aspettativa di vita, per cui il trapianto di fegato diventa l'unica opzione.

Tuttavia, i trapianti sono limitati da complicazioni chirurgiche, scarsità di donatori e rischio di rigetto [87-89]. La biostampa 3D rappresenta una promettente alternativa all'approccio allogenico, permettendo di creare tessuti epatici personalizzati e funzionali per studi farmacologici e per

potenziali trattamenti. Sviluppare questa tecnologia può comportare una riduzione della dipendenza dai trapianti, offrendo soluzioni paziente-specifiche mirate per le patologie del fegato, migliorando la qualità della vita dei pazienti e aumentando le possibilità di guarigione.

Come vedremo, le strutture 3D biostampate in questo studio presenteranno funzionalità analoghe a quelle degli epatociti *in vivo*, utili per valutare la risposta farmacologica rappresentando di fatto una diretta applicazione per la ricerca/sviluppo in ambito farmacologico.

Inoltre, lo studio evidenzia l'influenza dei parametri di stampa come pressione e lunghezza dell'ugello sulla vitalità cellulare.

4.3. Caso di studio

L'obiettivo principale della ricerca di Faulkner *et al.* è valutare la fattibilità della biostampa di cellule staminali pluripotenti umane senza comprometterne la vitalità e la capacità di differenziarsi. Questo è importante per stabilire se le hiPSCs (cellule staminali pluripotenti indotte umane) e le hESCs (cellule staminali embrionali umane) possano essere utilizzate per creare modelli di tessuto epatico umano funzionale utili per test farmacologici e studi sulla malattia [90].

4.3.3 Materiali e metodi

4.3.3.1 Linee cellulari

Particolare attenzione va data ad uno dei principali componenti dei bioinks: le cellule.

Nello studio in esame vengono utilizzate due linee cellulari differenti:

-hiPSCs: cellule staminali pluripotenti indotte umane

-hESCs: cellule staminali embrionali pluripotenti

Per le hiPSCs sono state utilizzate le linee specifiche RCi-22 e RCi-50 mentre per le hESCs le linee specifiche RC-6 e RC-10 tutte fornite da Roslin Cells Ltd.

4.3.1.2 . Accorgimenti di stampa

Nella biostampa di popolazioni cellulari delicate come le staminali, è molto importante prendere in considerazione la tecnologia di stampa adottata al fine di preservare le caratteristiche funzionali della cellula. Per questo scopo è stata utilizzata una biostampante a getto d'inchiostro a 4 valvole con sistemi di erogazione di volumi di liquido dell'ordine dei nanolitri, ciascuno composto da una valvola a solenoide (VHS Nanolitre Dispense Valve, Lee Products Ltd) con ugelli di 101,6 µm di diametro interno (Minstac Nozzle, Lee Products Ltd), collegati a serbatoi di pressione statica da cui la soluzione di bio-inchiostro viene erogata tramite tubi flessibili.

I sistemi di erogazione e i serbatoi dei bioinchiostri sono montati sulla testina dello strumento che consente la deposizione della soluzione in uno spazio xyz con risoluzione micrometrica. (figura 13) Lo strumento si compone di due canali di pressione indipendenti che consentono erogazioni differenziate per i bioinchiostri. Questo è molto importante quando si utilizzano bioinks con proprietà differenti, come per esempio l'alginato di sodio ed il cloruro di calcio, che necessitano di livelli pressori diversi per essere depositati correttamente.

Con questo setup sperimentale, adattando il tempo di impulso e il giusto livello pressorio, sono state stampate colture cellulari 2D di hiPSCs e strutture 3D a base di alginato cariche di hESCs.

Nel caso delle colture 2D, dove il materiale viene depositato in un singolo strato su un substrato, le condizioni di stampa sono meno complesse. Una pressione di 0,6 bar e un tempo di impulso di 8 ms consentono una corretta deposizione e distribuzione del bioink.

Per strutture 3D più complesse, in cui ogni strato depositato deve aderire a quello sottostante, le condizioni di stampa sono più complesse. La pressione in ingresso è 1 bar per l'alginato di sodio e 0,5 bar per il cloruro di calcio con un tempo di impulso di 400 μ s.

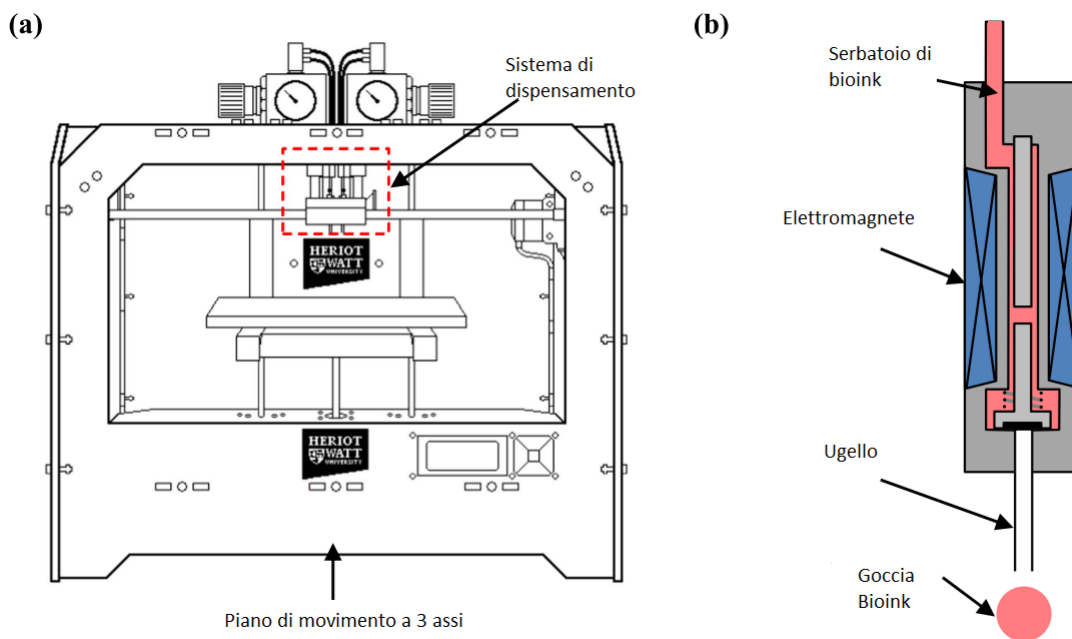


Figura 13. Schematizzazione biostampante ink-jet a 4 valvole (a); Schematizzazione micro-valvola solenoide (b).

4.3.1.3 Colture cellulari

Prima della differenziazione è necessario che le cellule coinvolte nel processo di biostampa vengano correttamente nutrite e mantenute correttamente in vita. Per fare tutto ciò è necessario mimare quanto più possibile le condizioni fisiologiche in cui esse si trovano naturalmente.

Per la coltura cellulare delle hiPSCs è stata utilizzata una matrice di Geltrex con il medium Essential 8 (Life Technologies), mentre le hESC sono state coltivate in un medium completo StemPro® hESC privo di siero e di *feeder cells* (come fibroblasti in co-cultura).

Entrambe le colture cellulari sono mantenute in un incubatore da laboratorio impostato in un range di temperatura compreso fra 36-37,5 °C e con il 5% di CO₂ con una tolleranza pari a $\pm 0,5\%$.

Successivamente, una volta espanso le cellule in numero sufficientemente elevato a coprire le necessità operative dello studio, queste vengono effettivamente utilizzate. Nello specifico metà coltura è stata utilizzata come *gold standard* (campioni di controllo o riferimento) mentre la restante metà è stata effettivamente utilizzata ai fini della biostampa.

4.3.1.4 Formulazione *hydrogel* 3D a base di alginato

Per la formazione degli *hydrogel* è stato utilizzato l'alginato di sodio accoppiato con la sequenza di adesione RGD (NOVATACH, sequenza: GRGDSP, Novamatrix), cloruro di calcio diidrato (223506, Sigma-Aldrich Co. LLC) e cloruro di bario (B0750, Sigma-Aldrich Co. LLC).

A livello operativo le strutture di *hydrogel* di alginato sono state bioprintate depositando una serie di goccioline di soluzione di alginato dal beccuccio sinistro e poi sovrapponendo goccioline di soluzione di calcio dal beccuccio destro. Dopo pochi secondi, le catene di alginato si legano agli ioni di calcio per formare una matrice gelificata. Se le goccioline adiacenti si sovrappongono, esse gelificano insieme e formano uno strato continuo. Inoltre, esponendo le strutture di *hydrogel* stampate al cloruro di bario, l'integrità strutturale aumenta.

In fase di stampa particolare attenzione è stata posta sui livelli pressori dei due ugelli in quanto cloruro di calcio e alginato di sodio, avendo viscosità differenti, richiedono livelli di pressione diversi. Quindi bisogna scegliere un giusto livello pressorio per il canale del cloruro di calcio, in modo da non allagare la struttura ed eccedere nella quantità di ioni calcio che deve essere ottimale per garantire una corretta reticolazione.

Con questi accorgimenti sono state correttamente prodotte strutture 3D a base di alginato con concentrazioni tra lo 0,1% e 5%, con un range pressorio da 0,1 bar fino a 1 bar.

Per il canale del cloruro di calcio invece è stata utilizzata una *driving force* più bassa.

4.3.2 Conclusioni e risultati

4.3.2.1 Vitalità cellulare e pluripotenza

Una volta espanso *in vitro*, le due linee cellulari sono state biostampate, in modo da poter valutare come il processo di stampa potesse influenzarne la vitalità e la pluripotenza.

In figura 14 vengono riportati i risultati in termini di vitalità cellulare delle hESC post biostampa ottenuti mediante tecnica FACS (citometria a flusso).

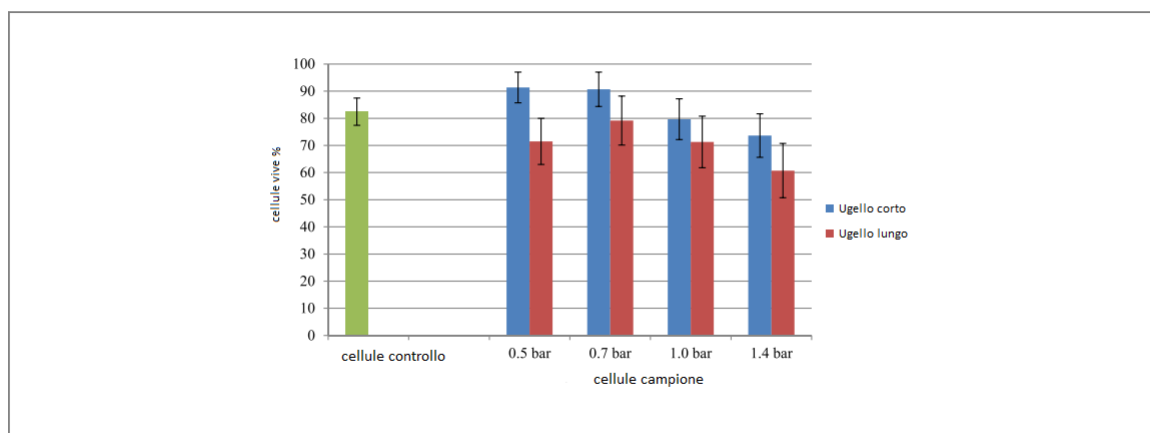


Figura 14. Vitalità cellulare di hESCs post-stampa 3D in relazione alla diversa pressione di deposizione e lunghezza dell'ugello, valutata a 30 minuti dalla biostampa.

La valutazione è stata fatta utilizzando diversi livelli pressori e due tipologie di ugelli, uno corto e uno più lungo, rispettivamente 8,9mm e 24,4mm.

In studi precedenti era già stata valutata l'influenza che il diametro dell'ugello ha sulla vitalità delle cellule, mentre non è mai stato analizzato l'impatto della sua lunghezza.

Come atteso, un aumento della pressione implica una diminuzione della vitalità cellulare; questo è dovuto alle maggiori forze di taglio che si verificano all'interfaccia soluzione e pareti interne dell'ugello. Le cellule hESCs presentano una buona vitalità per pressioni inferiori a 1 bar, il che è coerente con altri gruppi di cellule staminali analizzati [91].

Inoltre si può vedere come la lunghezza dell'ugello influenzi direttamente la vitalità: sono stati stimati valori >84% per l'ugello corto e >71% per quello lungo.

I diversi risultati tra ugello corto e lungo sono dovuti al diverso tempo di permanenza all'interno del condotto. Maggiore sarà quest'ultimo e maggiore sarà il tempo in cui le cellule sono sottoposte a sforzi di taglio.

Nel grafico sottostante invece riportiamo i risultati ottenuti per le hiPSCs mettendoli a confronto con i dati ottenuti dalla valutazione delle hESCs con gli stessi parametri di stampa.

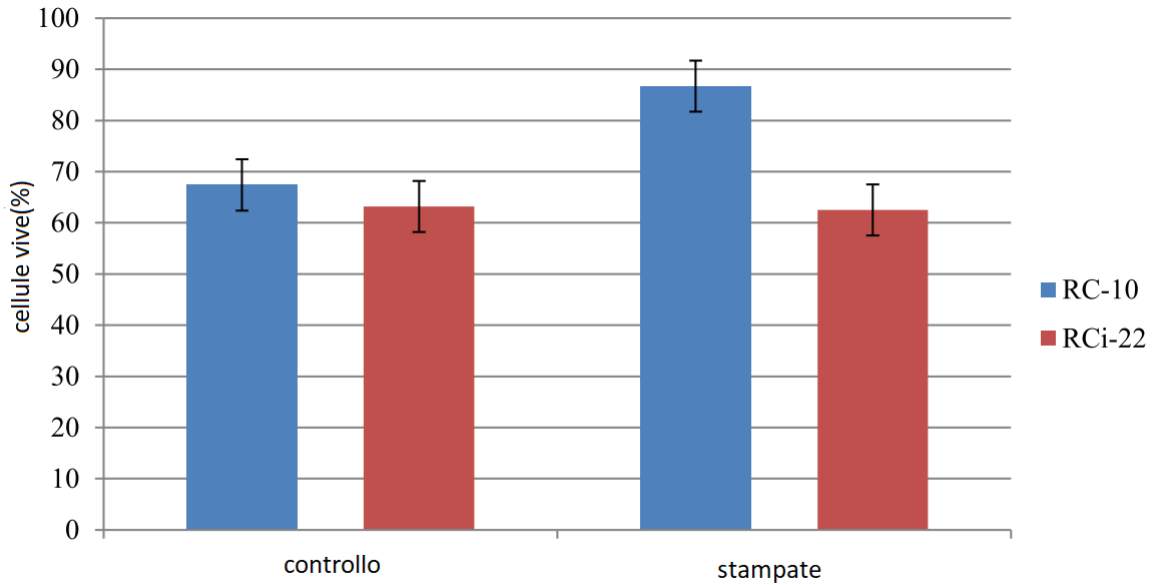


Figura 15. Vitalità cellulare di hiPSCs (RCi-22) e hESC (RC-10) a 30 minuti dalla biostampa

È bene precisare che sono stati presi opportuni provvedimenti sulle condizioni operative delle hiPSCs, in quanto queste linee cellulari risultano essere ancora più delicate rispetto le hESC.

Le condizioni operative di stampa migliori prevedono l'utilizzo di ugello corto e livello di pressione di 0,6 bar.

Va precisato che, oltre all'analisi della vitalità, sono state condotte analisi in merito alla pluripotenza qui non riportate. Anche sotto questo aspetto la biostampante *ink-jet* ha superato i test in quanto la pluripotenza è stata mantenuta.

4.3.2.2 Valutazione tessuto funzionale hepatocyte-like cells(HLCs)

Successivamente agli step di coltura, biostampa e valutazione della vitalità e della pluripotenza, si è passati al protocollo di differenziazione delle cellule staminali in HCL.

La biostampa della struttura 3D è avvenuta al giorno 6 del protocollo di differenziazione. Successivamente il costruito biostampato è stato portato in ambiente sterile di coltura fino al giorno 17, dopo di che sono avvenuti i test per la valutazione funzionale epatica tramite la rilevazione di appositi marker epatici: albumina, HNF4 α e ZO-1. Durante la fase di Bioprinting, sono state stampate strutture ad anello cariche di HLCs composte da 20 e 40 strati in matrici di *hydrogel* (figura 16)

I risultati hanno mostrato che queste strutture 3D possono sostenere la crescita cellulare e la differenziazione in epatociti in condizioni tridimensionali.

La stampa 3D ha richiesto pochi minuti e le strutture erano abbastanza robuste da supportare il proprio peso e quello degli strati successivi (come si vede in figura 17).

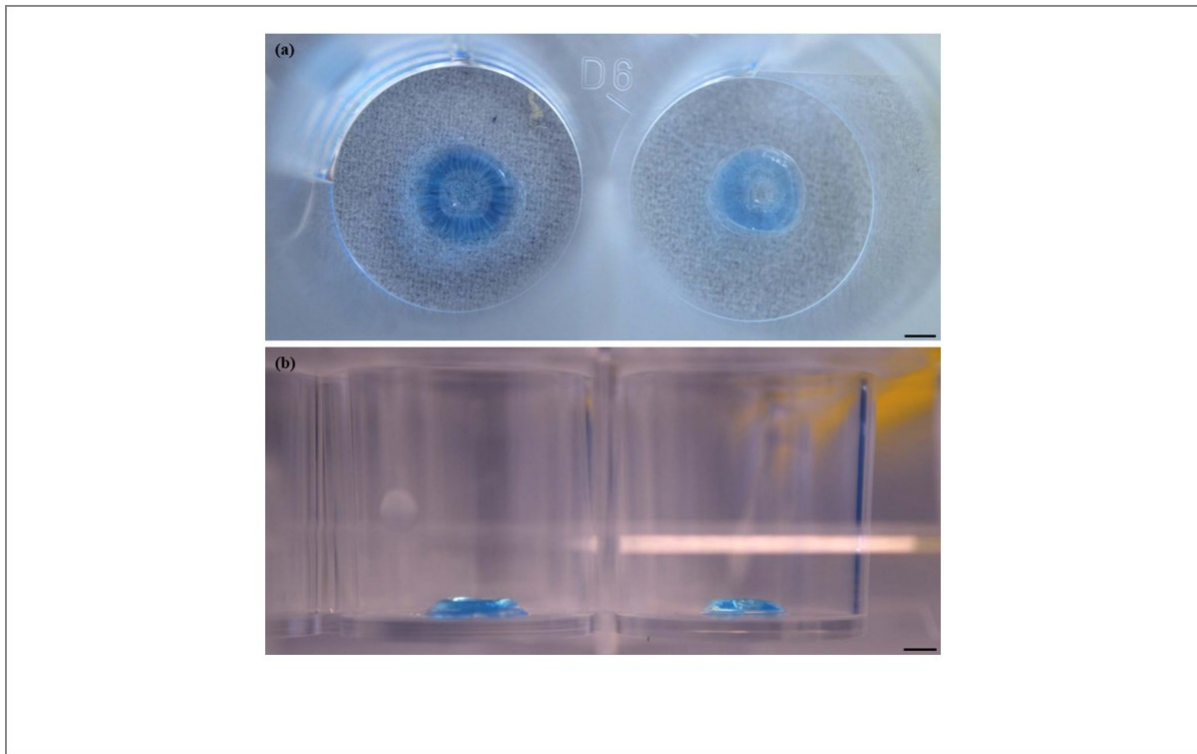


Figura 16. Strutture ad anello in alginato biostampate in 3D con 40 strati su piastra multi pozzetto(multi wells),con l'aggiunta di colorante blu per una maggiore chiarezza visiva: visuale della struttura dall'alto(a) e lateralmente(b). (barra di scala 2mm).



Figura 17. Struttura tubolare in alginato stampata in 3D, alta circa 13 mm, realizzata con soluzioni di alginato di sodio al 1,5% w/v e cloruro di calcio a 600 mM (6%) in acqua Millipore (barra di scala 2 mm).

La vitalità cellulare è stata monitorata nel tempo e, sebbene sia diminuita nelle prime 24 ore, si è stabilizzata durante il resto del processo di differenziazione.

Al giorno 23, le strutture rimanenti sono state raccolte e testate per valutare la presenza di marcatori epatici, mostrando un'espressione positiva di albumina, che conferma la natura epatica delle cellule (figura 18).

Inoltre, l'analisi della secrezione di albumina nei diversi giorni di differenziazione, ha indicato che le cellule stampate in 3D impiegano più tempo a raggiungere la massima secrezione di albumina rispetto ai controlli 2D, mostrando però un aumento quasi proporzionale in relazione al numero di strati stampati. Questo risultato suggerisce che l'*hydrogel* di alginato possiede una permeabilità sufficiente per consentire l'ingresso di nutrienti e reagenti di differenziazione, supportando così efficacemente la crescita e la differenziazione cellulare, indipendentemente dall'altezza della struttura stampata (figura 18c e figura 18d).

Nel complesso, questi risultati dimostrano che la biostampa di hPSCs e HLCs, in condizioni tridimensionali, con l'uso di *hydrogel* di alginato, può essere un metodo efficace per l'ingegneria tissutale, aprendo nuove possibilità per la produzione di tessuti epatici per applicazioni di medicina rigenerativa e sviluppo di farmaci senza uso di modelli animali [92, 93, 94].

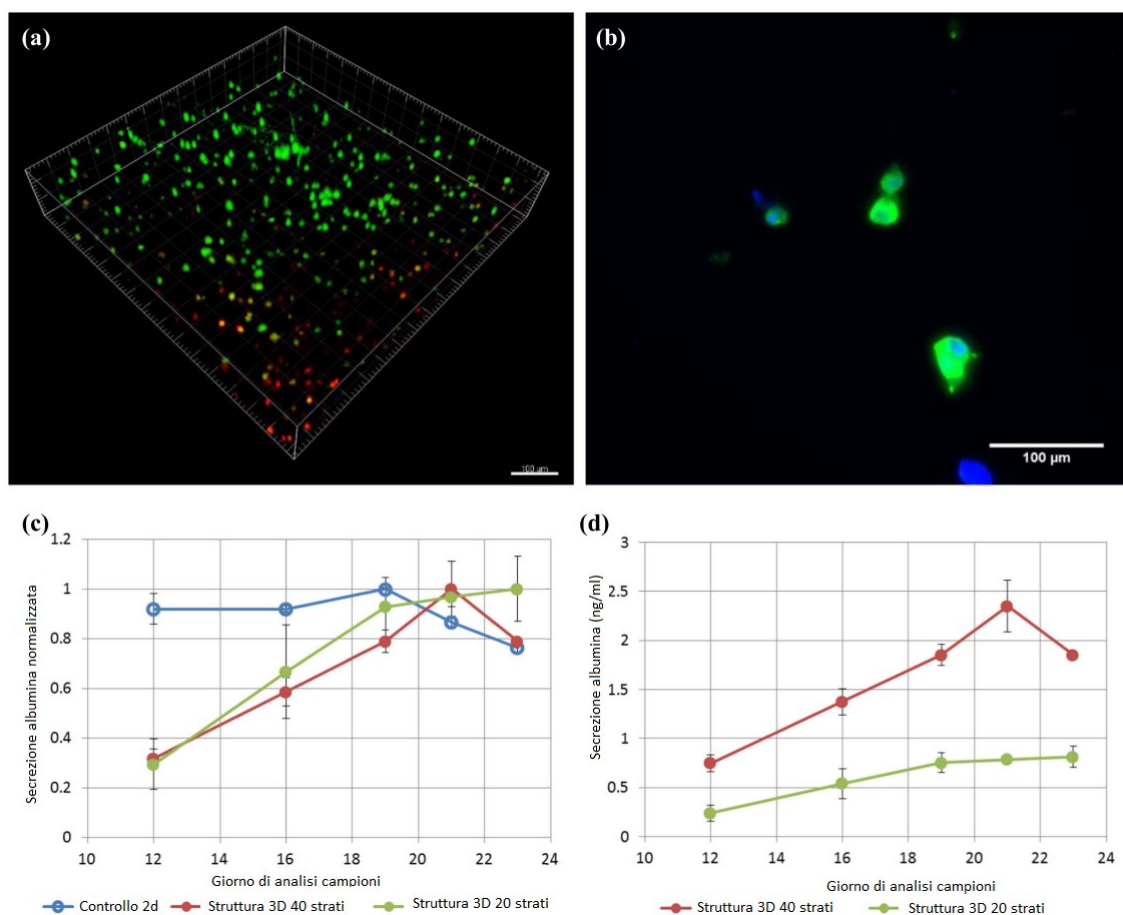


Figura 18. (a) e (b) Immagini di fluorescenza di epatociti derivati da hESC stampati: (a) un insieme 3D di HLC stampati in idrogel, registrato un'ora dopo la stampa, che mostra cellule vive in verde e cellule morte in rosso; (b) cellule 2D raccolte dall'alginate al giorno 23 che mostrano l'espressione dell'albumina in verde e DAPI in blu (barre di scala 100 μm); ((c) e (d)) grafici della secrezione di albumina durante il processo di differenziazione diretta per due strutture stampate in 3D con 40 e 20 strati, oltre a un controllo 2D: (c) secrezione di albumina normalizzata che mostra come la struttura 3D a 40 strati raggiunga il picco di secrezione di albumina dopo il controllo 2D (mostrato qui al giorno 21 e giorno 19 rispettivamente); (d) un confronto tra la secrezione assoluta di albumina delle due strutture stampate in 3D, che mostra che un numero maggiore di cellule stampate porta a una maggiore secrezione di albumina.

Riassumendo, l'uso di tecniche di biostampa 3D per la produzione di modelli di tessuto epatico in miniatura da cellule staminali pluripotenti, come le cellule staminali embrionali umane (hESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSCs), ha mostrato promettenti risultati nella preservazione della vitalità cellulare e nel mantenimento della pluripotenza post-stampa, dimostrando di fatto la versatilità e la potenza della tecnologia *ink-jet based*. Questo sicuramente è un ottimo risultato dal punto di vista tecnologico, dimostrando di fatto la validità dei sistemi di Bioprinting nel preservare caratteristiche essenziali come la pluripotenza.

Possiamo definirlo un punto di partenza verso lo sviluppo di tessuti sempre più complessi, che a partire da cellule staminali contenute in bioinks, porteranno ad un miglioramento della rigenerazione tissutale *in vivo*.

Capitolo 5

Limitazioni, prospettive future e conclusioni.

Il Bioprinting 3D, presentatosi come tecnica di stampa per depositare sequenze proteiche e cellule bovine, ha subito una rapida crescita tra gli inizi del 2000 ad oggi.

Come abbiamo visto gli avanzamenti sono stati possibili grazie uno sforzo della comunità scientifica su più fronti, tra i più importanti ovviamente troviamo l'ambito della biologia e della scienza dei materiali. Possiamo concludere, dai dati ricavati in letteratura, che nonostante si siano fatti innumerevoli passi avanti dal punto di vista tecnologico ad oggi, purtroppo, siamo ancora lontani da una vera e propria produzione di organi.

È però innegabile che questa tecnologia abbia rivoluzionato le moderne tecniche di coltura cellulare 2D, offrendo così svariate opportunità di ricerca biologica per capire quali sono i meccanismi mediante i quali le cellule comunicano, si replicano e generano nuovo tessuto.

Lo sviluppo di biomateriali adeguati alla creazione dei bioinchiostri si è dimostrato sicuramente un passo fondamentale nel settore; l'utilizzo di biopolimeri di origine naturale come alginato, cellulosa e chitosano ha abbattuto i problemi connessi alla tossicità ed alla non-biodegradabilità. La funzionalizzazione biochimica e la combinazione di più biomateriali per la formazione della soluzione *hydrogel*-cellule hanno permesso inoltre di ottenere bioink (ibridi) che presentano una combinazione di caratteristiche che li rendono di fatto più adattabili alla stampa.

L'impossibilità di mantenere un processo di biostampa per lungo tempo senza andare incontro a morte cellulare è sicuramente una limitazione in merito alla possibile produzione di organi. Inoltre l'assenza di vascolarizzazione rallenta ulteriormente questo processo. L'importanza di una struttura vascolare complessa è cruciale se si vuole garantire un 'adeguato apporto di nutrienti e ossigeno ai tessuti biostampati.

Anche le innovazioni però non mancano, per esempio la standardizzazione dei bioinks e delle tecniche di biostampa [95] sicuramente rappresenta uno step fondamentale permettendo all'utilizzatore di poter scegliere il bioinchiostro più adatto per il tessuto specifico da produrre.

La biostampa sta avanzando oltre il 3D, entrando nell'era del 4D. La stampa 4D utilizza strutture 3D "intelligenti" che possono essere programmate per modificare la loro forma e funzione in risposta a stimoli esterni come calore, luce ultravioletta, corrente elettrica, pressione e altre forme di energia [96, 97]. Un aspetto particolarmente innovativo è la biostampa senza supporti per la creazione di tessuti funzionali, che ha recentemente guadagnato attenzione. Un esempio è l'uso di placenta umana biostampata per studiare il trasporto di nutrienti dalla madre al feto. Questo approccio consente di

indagare condizioni potenzialmente gravi che potrebbero manifestarsi nella madre o nel bambino durante la gravidanza ed il parto.

Le nuove tecnologie emergenti, come la biostampa a ultrasuoni e la stampa 3D con materiali a cambiamento di fase, offrono ulteriori opportunità per ottimizzare la funzionalità dei tessuti stampati e rispondere più efficacemente alle esigenze cliniche.

Nonostante questi progressi, i modelli biostampati sono ancora in fase sperimentale e non possono essere utilizzati con successo come innesti per diversi tessuti a causa dell'ancora inadeguate proprietà meccaniche e morfologiche. Si prevede che la biostampa 3D raggiunga nuovi traguardi nei prossimi anni grazie all'evoluzione della medicina di precisione e allo sviluppo di tessuti complessi.

Bibliografia

1. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR (2003) Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol* 21(4):157–161.
2. Roth EA, Xu T, Das M, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2004) Inkjet printing for high throughput cell patterning. *Biomaterials* 25 (17):3707–3715
3. Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2005) Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* 26(1):93–99.
4. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR (2009) Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 30(12):2164–2174.
5. Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G (2009) Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* 30 (30):5910–5917.
6. Moldovan NI, Hibino N, Nakayama K (2017) Principles of the Kenzan method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part B Rev* 23 (3):237–244.
7. Pages E, Remy M, Keriquiel V, Correa M, Guillotin B, Guillemot F (2015) Creation of highly defined mesenchymal stem cell patterns in three dimensions by laser-assisted bioprinting. *J Nanotechnol Eng Med* 6(2):21006.
8. Breslin S, O’Driscoll L (2016) The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* 7(29):45745–45756.
9. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529.
10. Sheldon DF, McTaggart W (1986) CAD/- CAM: computer-aided design and manufacturing. *Comput-Aided Eng J* 3:34
11. Elanchezhian C, Shanmuga Sundar G (2007) Computer aided manufacturing. Firewall Media, New Delhi
12. Sutherland IE (1963) Sketchpad. In: Proceedings of the May 21–23, 1963, spring joint computer conference on—AFIPS ‘63 (Spring)
13. Sutherland IE (1964) Sketchpad a man-machine graphical communication system. *Simulation* 2:R–3–R–20
14. Herman GT (2009) Fundamentals of computerized tomography: image reconstruction from projections. Springer, New York
15. Hall EJ, Brenner DJ (2008) Cancer risks from diagnostic radiology. *Br J Radiol* 81:362–378

16. Vlaardingerbroek MT, Boer JA (2013) *Magnetic resonance imaging: theory and practice*. Springer Science & Business Media, New York
17. Thurston RN, Papadakis EP, Pierce AD (1998) *Ultrasonic instruments and devices II: reference for modern instrumentation, techniques, and technology*. Elsevier, Amsterdam
18. Bierig SM, Michelle Bierig S, Jones A (2009) Accuracy and cost comparison of ultrasound versus alternative imaging modalities, including CT, MR, PET, and angiography. *J Diagn Med Sonogr* 25:138–144
19. . Thomenius KE (2009) Miniaturization of ultrasound scanners. *Ultrasound Clin* 4:385–389
20. Hangiandreou NJ (2003) AAPM/RSNA physics tutorial for residents: topics in US. *Radiographics* 23:1019–1033
21. . Hull CW (1984) Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US Patent
22. Bandyopadhyay A, Bose S (2015) *Additive manufacturing*. CRC Press, Boca Raton
23. Mannoor MS, Jiang Z, James T et al (2013) 3D printed bionic ears. *Nano Lett* 13:2634–2639
24. . Koprnicky J, Najman P, Safka J (2017) 3D printed bionic prosthetic hands. In: 2017 IEEE International Workshop of Electronics, Control, Measurement, Signals and their Application to Mechatronics (ECMSM)
25. Baynes S (2016) *Printable Prosthetics: The Design of a 3D Printed Swimming Prosthesis: a Thesis Submitted to the Victoria University of Wellington in Fulfilment of the Requirements for the Degree of Master of Design*
26. Ba´rtolo PJ, Chua CK, Almeida HA et al (2009) Biomanufacturing for tissue engineering: present and future trends. *Virtual Phys Prototyp* 4:203–216
27. J. Groll, J.A. Burdick, D.-W. Cho, B. Derby, M. Gelinsky, S.C. Heilshorn, T. Jüngst, J. Malda, V.A. Mironov, K. Nakayama, A. Ovsianikov, W. Sun, S. Takeuchi, J.J. Yoo, T.B.F. Woodfield, A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks, *Biofabrication* 11 (2018) 013001
28. D. Williams, P. Thayer, H. Martinez, E. Gatenholm, A. Khademhosseini, A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting, *Bioprinting* 9 (2018)
29. A. Blaeser, A. Korsten, S. Neuss, H. Fischer, D.F. Duarte Campos, J. Jäkel, M. Vogt, The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages, *Tissue Eng. A* 21 (2014) 740–756

30. T.A. Busbee, J.A. Lewis, D.B. Kolesky, R.L. Truby, A.S. Gladman, K.A. Homan, 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs, *Adv. Mater.* 26 (2014) 3124–3130
31. D.F. Duarte Campos, B. Theek, A. Blaeser, H. Fischer, S. Neuss, W. JahnDechent, M. Weber, Biofabrication under fluorocarbon: a novel freeform fabrication technique to generate high aspect ratio tissue-engineered constructs, *Bioresour. Open Access* 2 (2013) 374–384
32. A. Blaeser, A. Korsten, S. Neuss, H. Fischer, D.F. Duarte Campos, J. Jäkel, M. Vogt, The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages, *Tissue Eng. A* 21 (2014) 740–756
33. A. Ewald, M. Schweinlin, K. Schacht, T. Jüngst, T. Scheibel, J. Groll, Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk constructs, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 2816–2820
34. F. Pati, J.-W. Rhie, D.-W. Cho, J. Jang, H.H. Han, D.-H. Ha, Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration, *Biomaterials* 62 (2015) 164–175
35. G.D. Prestwich, A. Skardal, J. Zhang, L. McCoard, S. Oottamasathien, Dynamically crosslinked gold nanoparticle-hyaluronan hydrogels, *Adv. Mater.* 22 (2010) 4736–4740
36. B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Rémy, L. Bordenave, J. Amédée j, F. Guillemot, Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization, *Biomaterials* 31 (2010) 7250–725
37. A. Souquet, J.C. Fricain, M. Rémy, B. Guillotin, M. Faucon, J. Amédée, F. Guillemot, S. Catros, J. Lopez, R. Bareille, B. Pippenger, S. Bellance, P. Chabassier, High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering, *Acta Biomater.* 6 (2009) 2494–2500,
38. N. Paxton, W. Smolan, T. Böck, F. Melchels, J. Groll, T. Jungst, Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability, *Biofabrication* 9 (2017) 044107
39. A. Atala, J.J. Yoo, W. Zhao, D. Dice, K.W. Binder, T. Xu, M.Z. Albanna, Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications, *Biofabrication* 5 (2012) 015001,
40. M. Müller, J. Becher, M. Schnabelrauch, M. Zenobi-Wong, Nanostructured pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting, *Biofabrication* 7 (2015) 35006,
41. M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, A. Jamshidi, A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels, *Chem. Eng. J.* 289 (2016) 38–47

42. Bootsma K, Fitzgerald M M, Free B, Dimbath E, Conjerti J, Reese G, Konkolewicz D, Berberich J A and Sparks J L 2017 3D printing of an interpenetrating network hydrogel material with tunable viscoelastic properties *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 70 84–94
43. Kirchmayer D M, Gorkin III R and in het Panhuis M 2015 An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing *J. Mater. Chem. B* 3 4105–17
44. R.E. Saunders, B. Derby, Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: bioprinting, *Int. Mater. Rev.* 59 (2014) 430–448
45. C.-H. Choi, L.-Y. Lin, C.-C. Cheng, C. Chang, Printed oxide thin film transistors: a mini review, *ECS J. Solid State Sci. Technol.* 4 (2015) P3044–P3051,
46. P.L. Hue, Progress and trends in ink-jet printing technology, *J. Imaging Sci. Technol.* 42 (1998) 49–62.
47. Print Quality Optimization for a Color Ink-Jet Printer by Using a Larger Nozzle for the Black Ink Only, (1994)
48. J Method and Apparatus for Reducing the Size of Drops Ejected from a Thermal Ink Jet Printhead, (1994)
49. Ink Drop Volume Variance Compensation for Inkjet Printing, (1997)
50. T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J.J. Hickman, T. Boland, Inkjet printing of viable mammalian cells, *Biomaterials* 26 (2005) 93–99,
51. X. Cui, D. Dean, Z.M. Ruggeri, T. Boland, Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 963–969,
52. X. Cui, T. Boland, Human microvasculature fabrication using thermal inkjet
53. printing technology, *Biomaterials* 30 (2009) 6221–6227,
54. G. Gao, T. Yonezawa, K. Hubbell, G. Dai, X. Cui, Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging, *Biotechnol. J.* 10 (2015) 1568–1577
55. P. Ihalainen, A. Määttänen, N. Sandler, Printing technologies for biomolecule and cell-based applications, *Int. J. Pharm.* 494 (2015) 585–592
56. Yerazunis WS (2016) Strengthening ABS, nylon, and polyester 3D printed parts by stress tensor aligned deposition paths and five-Axis printing. International Solid Freeform Fabrication Symposium
57. Grutle ØK (2015) 5-axis 3D printer. University of Oslo, Oslo
58. Kleefoot M (2016) ZHAW Master students develop novel 3D printers. Media Office ZHAW
59. Reinhardt D, Saunders R, Burry J (2016) *Robotic fabrication in architecture, art and design 2016*. Springer International Publishing, New York

60. 3. Shi J (2014) Robotic extrusion (6-axis KUKA + ABS 3D printing).
61. . NaGao E, Zhang G, Kizawa H (2015) 3D printed human liver-like tissue shows high level and sustained drug metabolic function. Third Annual Congress of Functional Analysis and Screening Technologies, Boston
62. . Lee VK, Dias A, Ozturk MS, Chen K, Tricomi B, Corr DT, Intes X, Dai G (2015) 3D bioprinting and 3D imaging for stem cell engineering. In: Turksen K (ed) Bioprinting in regenerative Medicine. Springer International Publishing, Cham, pp 33–66
63. Fielding GA, Bandyopadhyay A, Bose S (2012) Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. *Dent Mater* 28(2):113–12
64. Malda J, Visser J, Melchels FP, Ju'ngst T, Hennink WE, Dhert WJA, Groll J, Hutmacher DW (2013) 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater* 25(36):5011–5028.
65. Billiet T, Gevaert E, De Schryver T, Cornelissen M, Dubruel P (2014) The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials* 35(1):49–62
66. Dababneh AB, Ozbolat IT (2014) Bioprinting technology: a current state-of-the-art review. *J Manuf Sci Eng* 136(6):061016.
67. . Chang R, Nam J, Sun W (2008) Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on 88 Kelsey Willson et al. cell survival from solid freeform fabricationbased direct cell writing. *Tissue Eng A* 14 (1):41–48.
68. . Faulkner-Jones A, Fyfe C, Cornelissen DJ, Gardner J, King J, Courtney A, Shu W (2015) Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D. *Biofabrication* 7 (4):044102.
69. P. Zorlutuna, R. Bashir, H. Kong, V. Chan, J.H. Jeong, Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation, *Lab Chip* 10 (2010) 2062
70. G. Mapili, Y. Lu, S. Chen, K. Roy, Laser-layered microfabrication of spatially patterned functionalized tissue-engineering scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 75 (2005) 414–424,
71. O'Connell CD, Zhang B, Onofrillo C et al (2018) Tailoring the mechanical properties of gelatin methacryloyl hydrogels through manipulation of the photocrosslinking conditions. *Soft Matter* 14:2142–2151

72. . Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR (2004) Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed Microdevices* 6(2):139–147
73. J. Bohandy, B.F. Kim, F.J. Adrian, Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser, *J. Appl. Phys.* 60 (1986) 1538–1539
74. D.B. Chrisey, Materials processing: the power of direct writing, *Science* 289 (2000) 879–881
75. M. Colina, P. Serra, J.M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, J.L. Morenza, DNA deposition through laser induced forward transfer, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1638–1642,
76. V. Dinca, E. Kasotakis, J. Catherine, A. Mourka, A. Ranella, A. Ovsianikov, B.N. Chichkov, M. Farsari, A. Mitraki, C. Fotakis, Directed three-dimensional patterning of self-assembled peptide fibrils, *Nano Lett.* 8 (2008) 538–543,
77.] C.B. Arnold, P. Serra, A. Piqué, Laser direct-write techniques for printing of complex materials, *MRS Bull.* 32 (2007) 23–32,
78. S. V Murphy, A. Atala, 3D bioprinting of tissues and organs, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 773–785,
79. F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering, *Nanomedicine* 5 (2010) 507–515
80. S. Catros, B. Guillotin, M. Bačáková, J.-C. Fricain, F. Guillemot, Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by laser-assisted bioprinting, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 5142–5147
81. Z. Xie, P. Li, J.P. Lata, Z. Mao, Y. Chen, J. Liu, L. Ren, F. Guo, M. Dao, S. Suresh, J. Yang, T.J. Huang, Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 1522–1527
82. Q. Gu, J. Hao, Y.J. Lu, L. Wang, G.G. Wallace, Q. Zhou, Three-dimensional bioprinting, *Sci. China Life Sci.* 58 (2015) 411–419,
83. Caleffi, J.T.; Aal, M.C.E.; Gallindo, H.D.O.M.; Caxali, G.H.; Crulhas, B.P.; Ribeiro, A.O.; Souza, G.R.; Delella, F.K. Magnetic 3D Cell Culture: State of the Art and Current Advances. *Life Sci.* 2021, 286, 120028
84. Haisler, W.L.; Timm, D.M.; Gage, J.A.; Tseng, H.; Killian, T.C.; Souza, G.R. Three-Dimensional Cell Culturing by Magnetic Levitation. *Nat. Protoc.* 2013, 8, 1940–1949
85. B.R. Whatley, X. Li, N. Zhang, X. Wen, Magnetic-directed patterning of cell spheroids, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 1537–1547

86. H. Tseng, J.A. Gage, T. Shen, W.L. Haisler, S.K. Neeley, S. Shiao, J. Chen, P.K. Desai, A. Liao, C. Hebel, R.M. Raphael, J.L. Becker, G.R. Souza, A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–11
87. S.J. Yu, A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world: 2010-2016, *Clin. Mol. Hepatol.* 22 (2016) 7–17
88. I.V. Kholodenko, K.N. Yarygin, Cellular mechanisms of liver regeneration and cellbased therapies of liver diseases, *BioMed Res. Int.* (2017) 1–17
89. A. Tayyeb, F. Azam, R. Nisar, R. Nawaz, U. Qaisar, G. Ali, Regenerative medicine in liver cirrhosis: promises and pitfalls, *Liver Cirrhosis - Updat. Curr. Challenges*, InTech, 2017,
90. J W. Shu, A. Courtney, C. Fyfe, D.-J. Cornelissen, A. Faulkner-Jones, J. Gardner, J. King, Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D, *Biofabrication* 7 (2015) 044102,
91. Raof N A, Schiele N R, Xie Y and Chrisey D B 2011 The maintenance of pluripotency following laser direct-write of mouse embryonic stem cells *Biomaterials*
92. Zhao Y, Yao R, Ouyang L, Ding H, Zhang T, Zhang K, Cheng S and Sun W 2014 Three-dimensional printing of hela cells for cervical tumor model in vitro *Biofabrication*
93. Marchioli Get al 2015 Fabrication of three-dimensional bioplotted hydrogel scaffolds for islets of Langerhans transplantation *Biofabrication*
94. Dixon J E, Shah D A, Rogers C, Hall S, Weston N, Parmenter C D J, McNally D, Denning C and Shakesheff K M 2014 Combined hydrogels that switch human pluripotent stem cells from self-renewal to differentiation *Proc. Natl Acad. Sci*
95. Y.M. Balakhovsky, A.Y. Ostrovskiy, Y.D. Khesuani, Emerging business models toward commercialization of bioprinting technology, *3D Print. Biofabrication*, Springer International Publishing, Cham, 2017, pp. 1–22
96. S. Miao, N. Castro, M. Nowicki, L. Xia, H. Cui, X. Zhou, W. Zhu, S. Lee, K. Sarkar, G. Vozzi, Y. Tabata, J. Fisher, L.G. Zhang, 4D printing of polymeric materials for tissue and organ regeneration, *Mater. Today* 20 (2017) 577–591
97. Z. Zhang, K.G. Demir, G.X. Gu, Developments in 4D-printing: a review on current smart materials, technologies, and applications, *Int. J. Smart Nano Mater.* 10 (2019) 205–224