

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Bioprinting

metodi , applicazioni, prospettive

LAUREANDO:

Francesco Dal Dosso

RELATORE:

Dott. Andrea Bagno

Anno Accademico 2009/2010

INDICE

Abstract	V
1. Introduzione	1
1.1 Tissue Engineering	1
1.2 Bioprinting	4
1.3 Da dove nasce il bioprinting	7
1.4 Applicazioni pratiche	10
2. Tecniche e strumenti	13
2.1 Stampante	13
2.2 Struttura stampante	14
2.2.1 Cell delivery system	14
2.2.2 Motion system	16
2.2.3 Control hardware and software	16
2.3 Limitazioni nella stampa	17
2.3.1 Aggregazione cellulare e salt scaling	17
2.3.2 Cell damage	20
2.4 Maturogenetic factors	22
2.5 Pulizia cartucce	23
3. Materiali	25
3.1 Biomateriali	25
3.2 Proprietà	26
3.2.1 Materiali biocompatibili	26
3.2.2 Materiali biodegradabili	26

3.2.3	Materiali bioattivi	27
3.2.4	Materiali biorisorbibili	27
3.2.5	Proprietà meccaniche	27
3.3	Biomateriali di sintesi e naturali	28
3.3.1	Biomateriali di sintesi	28
3.3.2	Biomateriali naturali	29
3.4	Bioink	32
3.4.1	Cell culture	32
3.4.2	Composizione bioink	33
3.5	Biopaper	33
4.	Scaffold	35
4.1	Cos'è lo scaffold	35
4.2	Pro e contro	36
4.3	Scaffold in poliuretano	37
4.3.1	Poliuretani di test	37
4.3.2	Proprietà meccaniche	38
4.3.3	Analisi della degradazione	39
4.3.4	Analisi della citocompatibilità	40
4.3.5	Conclusioni	41
4.4	Scaffold per il rilascio di fattori di crescita	42
4.4.1	Materiali impiegati	42
4.4.2	Procedura di stampa	42
4.4.3	Risultati	43
4.5	Scaffold 3D con canali integrati	45
4.5.1	Procedura di stampa	45
4.5.2	Risultati	46

5. Vasi sanguigni	49
5.1 Importanza vasi sanguigni	50
5.2 Problemi nell'uso di scaffold	50
5.3 Vasi <i>scaffold-free</i>	51
5.3.1 Materiali impiegati	51
5.3.2 Risultati	52
5.4 Microvasi con HMVEC e fibrina	54
5.4.1 Materiali impiegati	54
5.4.2 Risultati	55
6. Conclusioni	57
6.1 Stato attuale	57
6.1.1 Tessuto nervoso	57
6.1.2 Tessuto epatico	59
6.2 Previsioni future	60
6.2.1 Organ printing	61
6.3 Ricercatori e aziende	63
6.3.1 Persone	63
6.3.2 Aziende	63
Bibliografia	67

ABSTRACT

Nell'area del tissue engineering si sta affermando una nuova tecnica: il bioprinting. Si tratta di un approccio automatizzato che, tramite software e hardware dedicati, depone *drop-on-demand* materiale biologico su un supporto per produrre tessuti da impiegare in ambito medico. Il bioprinting si basa sostanzialmente su tre "B": il Bioink, è la soluzione, costituita in prevalenza da cellule, che viene deposta sulla Biopaper, scaffold naturale e biorisorbibile che funge da matrice, attraverso la Bioprinter, stampante inkjet modificata. Queste cellule fondendosi daranno vita alla struttura desiderata. Nella presente tesi, sono analizzate la tecnica e le caratteristiche (Capitoli 2 e 3) e presentati i risultati finora raggiunti, come la realizzazione di scaffold innovativi (Capitolo 4), di microvasi sanguigni (Capitolo 5) e di altri tessuti (Capitolo 6).

1. INTRODUZIONE

1.1 Tissue Engineering

Il tissue engineering è un campo di ricerca multidisciplinare emerso recentemente all'interno dell'area dei biomateriali che sta avendo una crescente diffusione nella comunità scientifica [1].

I primi articoli in cui si cominciò a parlare delle tecniche e degli approcci che confluirono nel tissue engineering furono pubblicati nella seconda metà degli anni ottanta del secolo scorso. Le pubblicazioni nel corso di questi venticinque anni si sono fatte sempre più numerose e ampie.

Una prima definizione del Dr. Langer di cos'è il tissue engineering è stata:

"an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ" [2]

L'Ingegneria dei Tessuti (TE) è una scienza multidisciplinare che, attraverso i principi della chimica, della biochimica, della medicina, dell'ingegneria, della fisica e della matematica, si propone di costruire *in vitro* tessuti biologici destinati alla sostituzione di parti del corpo umano danneggiate o affette da patologie [2].

In altre parole il tissue engineering si potrebbe definire come l'integrazione tra l'impiego di sostanze biologiche, tecniche ingegneristiche e i materiali usati in ambito biologico. Tutto ciò sfrutta poi le proprietà biochimiche e i fattori fisico-chimici delle sostanze usate e quelle dell'ambiente biologico del nostro organismo.

Lo scopo principale del tissue engineering è di creare tessuti corporei di varia natura (epiteliali, vascolari, nervosi, ossei, cartilaginei, ...) da poter poi impiantare in pazienti che ne necessitino. Creare quindi un sistema che permetta in laboratorio di fabbricare tessuti da poter poi essere usati sull'uomo per impianti o sostituzione di tessuti danneggiati.

Gli enormi progressi scientifici, fatti in questi ultimi anni, nel campo dei biomateriali, sull'utilizzo di cellule staminali, sui fattori di crescita cellulare e sugli ambienti biomimetici hanno creato i presupposti per l'affermazione e l'impiego clinico di alcune tecniche legate al tissue engineering.

Semplificando si può dire che le varie tecniche di tissue engineering si compongono da quattro parti fondamentali:

- cellule;
- molecole biologiche;
- scaffold;
- fattori di crescita.

Per ottenere le cellule da usare vi sono vari metodi, ma una prima distinzione si può fare tra le cellule di tessuti fluidi come il sangue, o le cellule di tessuti solidi come la pelle. Nel primo caso si usano metodi come la centrifugazione o l'afèresi per separare le cellule dagli altri componenti.

Per quanto riguarda invece le cellule di tessuti solidi si procede prima alla frammentazione del tessuto e poi tramite l'impiego di enzimi, che digeriscono la matrice extracellulare, si ottengono cellule in ambiente liquido che verranno trattate come nel primo caso.

Le cellule impiegate possono essere di vario tipo:

- autologhe: prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto. Questo tipo di cellule abbatte drasticamente i problemi di rigetto e di trasmissione di malattie;
- allogene: provenienti da un donatore della stessa specie;

- xenogeniche: ottenute da un donatore di un'altra specie;
- staminali: cellule indifferenziate che hanno la capacità crescendo di dividersi in cellule specializzate di vario tipo.

Lo Scaffold è un supporto in cui vengono generalmente impiantate le cellule e fornisce un sostegno alla crescita del tessuto. Gli Scaffold possono essere biodegradabili o permanenti, naturali o sintetici, ma devono sempre essere biocompatibili.

Le funzioni dello Scaffold oltre a quella di sostegno, sono anche di permettere l'adesione e il movimento delle cellule e fungere da trasportatore di fattori biochimici (e.g. grow factors) e di sostanze necessarie allo sviluppo delle cellule. Materiali sintetici usati sono ad esempio il PLA (acido polilattico), PGA (acido poliglicolico) e il PCL (acido policaprolattone) e molti altri sviluppati recentemente.

Molti materiali naturali sono derivati dalla ECM come fibrina e GAGs. Tra i GAGs uno dei più usati è l'acido ialuronico, abbondantemente presente nel nostro organismo.

I fattori di crescita o grow factors servono per far maturare il tessuto appena stampato il più velocemente possibile. Vi è un ampio margine di miglioramento in questo ambito, infatti al momento la tecnica più usata prevede l'impiego di bioreattori con tempi di maturazione anche di mesi. Il passaggio quindi da una struttura allo stato liquido a una solida dove le varie sfere di bioink si sono fuse assieme, è un fattore fondamentale e al momento limitante [3]. Nel capitolo 2.4 si esporranno dei nuovi approcci riguardo questo aspetto.

Due differenti approcci si sono evidenziati negli ultimi anni: Top-down e Bottom-up. Il primo prevede l'uso di tecniche microingegneristiche per controllare e modificare le micro caratteristiche di una grande struttura preesistente. L'approccio Bottom-up prevede l'utilizzo di piccoli blocchi successivamente assemblati insieme [4]. Assomiglia quindi molto a quello che

succede in natura dove spesso le strutture complesse sono formate dall'assemblaggio organizzato di unità funzionali elementari. Quindi partendo da piccole unità funzionali tutte uguali, si può formare una più complessa e modulare struttura come uno scaffold. Il bioprinting è una tecnica Bottom-up [5] dove le piccole unità funzionali non sono altro che gocce di bioink.

1.2 Bioprinting

Una delle più recenti e promettenti tecniche di tissue engineering è il bioprinting. I pionieri di questa tecnica sono stati Thomas Boland e Vladimir Mironov. Fin dai loro primi lavori, risalenti a non più di dieci anni fa, la comunità scientifica si è progressivamente interessata a questo innovativo approccio. Il lavoro di varie equipe ha portato significativi risultati in un campo di ricerca che è ancora in fase embrionale ma che presenta notevoli e promettenti margini di sviluppo.

Una prima definizione di cosa fosse il Bioprinting fu data nel “ First International Workshop on Bioprinting and Biopatterning” a Manchester (UK) nel 2004:

“the use of material transfer processes for patterning and assembling biologically relevant materials, molecules, cells, tissues, and biodegradable biomaterials with a prescribed organization to accomplish one or more biological functions” [5]

Nell'ultimo workshop del 2009 a Bordeaux è stata data un'altra definizione che amplia e migliora la precedente:

“the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bio-engineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetic and basic cell biology studies” [5]

Quindi in sostanza il Bioprinting consiste in una tecnica che, tramite l'impiego di software e hardware dedicati per la progettazione di schemi e strutture in 2D e 3D, si prefigge di produrre una struttura o tessuto ingegnerizzato da poter utilizzare in medicina rigenerativa (approccio terapeutico finalizzato alla rigenerazione biologica del tessuto anziché alla sua sostituzione) o come materiale per test e studi biologici e farmacologici [5].

Il bioprinting, sfruttando la tecnologia delle comuni stampanti a getto d'inchiostro, utilizza uno speciale bioink costituito da cellule che viene depositato drop-on-demand su una speciale carta, biopaper (gel biocompatibile), strato su strato formando così delle strutture tridimensionali. La tecnica sfrutta poi la capacità autonoma delle cellule di fondersi tra di loro se si trovano in contatto creando così una struttura compatta e unica.

Questa tecnica si basa sostanzialmente su tre "B": Bioink, Biopaper, Bioprinter (figura 1.2).

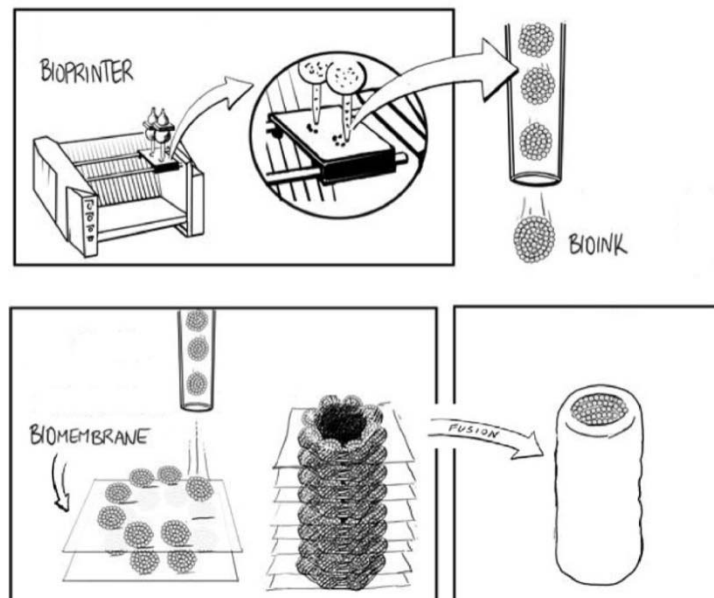


Figura 1.2: Processo schematico bioprinting

Alcuni dei più importanti e caratteristici aspetti del bioprinting sono:

- drop-on-demand: consiste nella possibilità di depositare le gocce di bioink tramite un sistema di controllo computerizzato solo quando e dove vi è bisogno per ricreare l'immagine o la sequenza voluta. Inoltre consente di controllare la densità del materiale "stampato" e variarla a seconda della zona. Permette quindi un'altissima personalizzazione della deposizione della soluzione cellulare;
- solid freeform fabrication (SFF) [2,6]: il bioprinting non ha limitazioni sulla forma e la consistenza della struttura voluta. Tramite l'elaborazione automatica delle immagini CAD (Computer Aided Design) e la fabbricazione assistita al calcolatore CAM (Computer Aided Manufacturing) si possono realizzare complesse strutture tridimensionali a partire da dati e immagini provenienti da indagini mediche, come ad esempio la risonanza magnetica (MRI) e la tomografia assiale computerizzata (TAC). Tali immagini possono essere elaborate con tecnologie denominate Rapid Prototyping (RP) o Solid Freeform Fabrication (SFF) che consentono di predefinire al calcolatore la forma microscopica e macroscopica dello scaffold;
- layer-by-layer: le gocce di bioink vengono depositate sul primo strato di biopaper dopodiché viene sovrapposto un altro strato di biopaper che viene a sua volta seminato di cellule. Iterando questo procedimento si viene a formare una struttura in 3D costituita da "foglietti" in 2D che poi fondendosi insieme costituiranno un sistema unico;
- il bioprinting permette inoltre, usando più cartucce, la simultanea deposizione di più soluzioni. Ad esempio può essere iniettato il materiale per lo scaffold di supporto e contemporaneamente il bioink;
- uno degli altri grandi vantaggi è di creare strutture solid-scaffold-free, quindi senza gli aspetti negativi degli scaffold tradizionali (rigetto, biocompatibilità, bassa customizzazione, bassa crescita cellulare ...);

- uno dei più gravi problemi dei tessuti ingegnerizzati è la mancanza di nutrienti e ossigeno per la crescita e sopravvivenza delle cellule a causa della mancanza di vascolarizzazione del tessuto. Tramite il bioprinting si è riusciti a ricreare una rete di micro vasi sanguigni che in futuro potrebbero essere integrati con altri tipi di tessuto per supportarli;
- presenta una maggior velocità di esecuzione rispetto altre tecniche ma soprattutto vi sono concrete possibilità di rendere il processo automatico e quindi in futuro industrializzabile, con evidenti vantaggi sui costi e sulla sua diffusione.

1.3 Da dove nasce il bioprinting

Come tutte le più recenti scoperte, anche il bioprinting non nasce dal nulla ma si basa su studi e tecniche precedenti. Si tratta quindi di una fusione tra rivisitazioni di scoperte passate e nuovi approcci maturati grazie al progresso scientifico e tecnologico. Alcuni delle principali teorie su cui si basa sono di seguito elencate:

- l'istologo e medico tedesco Gustav Born (1851-1900) studiando gli embrioni di specie anfibie, si accorse che tagliando due differenti embrioni e mettendone in contatto le zone di taglio, queste si fondevano in un'unica struttura (figura 1.3.1) [7];

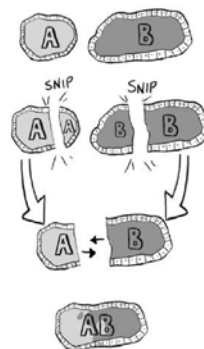


Figura 1.3.1: rappresentazione esperimento di Born

- il biologo americano H. V. Wilson (1863-1939) nel 1907 pubblicò un articolo in cui presentò uno studio condotto sulle cellule delle spugne marine. Si accorse che separando le cellule e ponendole in una soluzione salina queste si raggruppavano formando nuove spugne. Inoltre se le cellule provenivano da due specie di spugne differenti queste non si mischiavano in organismi ibridi ma si univano solo fra cellule della stessa specie [7];
- il professore di ingegneria biomedica al MIT Robert Langer fu, nel 1974, il primo che tradusse le conoscenze fino ad allora acquisite nella produzione di uno scaffold polimerico per l'impianto e la crescita di cellule umane. Per questo suo contributo è considerato uno dei padri del tissue engineering (figura 1.3.2) [7];

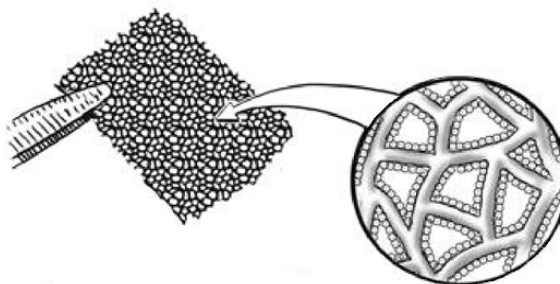


Figura 1.3.2: esempio tessuto ingegnerizzato

- l'embriologo tedesco J. Holtfreter (1901-1992) studiò tra le altre cose le interazioni tra i tessuti. In particolare disaggregò degli embrioni anfibici (Gastrula) e si accorse che i tre tipi di cellule di cui erano formati si riaggregavano secondo uno schema prevedibile e non in modo casuale (figura 1.3.3) [7];

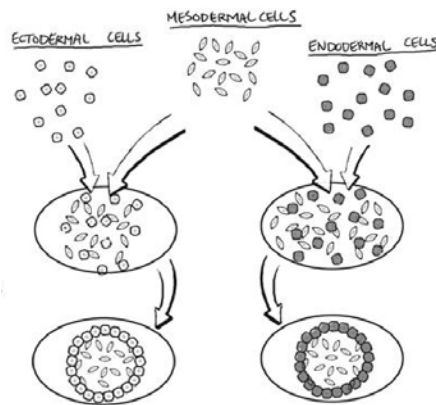


Figura 1.3.3: rappresentazione esperimento di Holtfreter

- il professore di biologia molecolare a Princeton M. Steinberg ipotizzò che i differenti tipi di cellule si raggruppavano tra loro seguendo le caratteristiche di adesione. Ad esempio un tipo di cellule che differisce per proprietà di adesione con un altro lo circonda inglobandolo. Questa ipotesi e le proprietà che ne conseguono stanno alla base del bioink [7];
- a partire dai primi anni '60, con il lavoro del biologo Paul Weiss, si dimostrò che la formazione di tessuti in vitro a partire da singole cellule era possibile [8].

Anche per la tecnica del bioprinting si è capito che, per poter produrre qualcosa che possa poi essere effettivamente compatibile il più possibile con il nostro organismo, si dovrebbe avere come modello la natura e i suoi processi. Per questo si sta cercando di capire a fondo e sfruttare le dinamiche che portano alla formazione dei tessuti, organi, apparati in fase embrionale. Processi naturali come l'organogenesi, l'istogenesi, l'angiogenesi, la moltiplicazione e l'organizzazione cellulare, il comportamento delle cellule staminali devono essere studiati e implementati nelle tecniche artificiali come il bioprinting. Va sottolineato come ad esempio durante la formazione dei tessuti il nostro organismo non impiega nessun tipo di supporto (scaffold), quindi un approccio

solid-scaffold-free sarà probabilmente da preferire e ricercare rispetto a uno che fa uso di supporti solidi esterni.

1.4 Applicazioni pratiche

L'uso di tecniche come il bioprinting e più in generale del tissue engineering può avere impiego in vari campi della ricerca medica e farmacologica e della medicina rigenerativa. Il sogno e l'obiettivo futuro è quello di riuscire a ricreare ampi e vari tessuti da poter impiegare direttamente sull'uomo per riparare o sostituire i tessuti danneggiati. Fino ad ora le ricerche si sono incentrate in particolare sulla creazione di vasi sanguigni poiché senza il loro contributo altri tessuti non potrebbero sopravvivere e crescere a causa del mancato apporto di ossigeno e sostanze nutritive. Altri tessuti riprodotti in piccole quantità sono il tessuto epiteliale, nervoso, cardiaco, epatico, osseo e cartilagineo.

Il traguardo ancora più ambizioso è quello di riuscire in futuro a combinare vari tessuti e vascolarizzandoli creare dei veri e propri organi funzionanti con cui sostituire quelli danneggiati dei pazienti. Il problema principale legato all'utilizzo di organi artificiali sta nel voler sostituire una parte di un complesso sistema vivente con una protesi, cioè un sistema artificiale inevitabilmente più semplificato [8]. Anche se tale approccio è stato notevolmente implementato negli ultimi anni, grazie ai progressi fatti nel campo dell'ingegneria biomedica, ad oggi si riscontrano ancora problemi legati alla biocompatibilità e biofunzionalità. In particolare, la biofunzionalità si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione del tessuto, dal punto di vista fisico e meccanico; la biocompatibilità, invece è la capacità del materiale di integrarsi nel tessuto-bersaglio senza causare reazioni di rigetto o in qualsivoglia modo nocive all'organismo [2].

Questo permetterebbe di alleggerire o soppiantare la tecnica del trapianto d'organi da donatore che comporta problemi medici (e.g. rigetto) e superare le

limitazione legate alla carenza di donatori a fronte di una sempre maggiore richiesta di organi e tessuti [2].

Oltre all'aspetto prettamente medico dell'impianto o riparazione di tessuti danneggiati, vi è un altro aspetto molto importante: l'uso di questi tessuti ingegnerizzati come supporto allo studio e alla ricerca su malattie e patologie ancora non del tutto conosciute o curabili. Lo sviluppo in vitro di modelli tissutali estremamente simili dal punto di vista chimico fisico biologico e meccanico ai tessuti umani, ha il vantaggio di fornire supporti per procedure di test di medicinali, vaccini, e terapie innovative [9].

Uno dei problemi che rallentano e limitano l'applicazione medica di questa tecnica è la necessità di utilizzare dei bioreattori per far maturare e crescere gli aggregati di cellule (figura 1.4). Infatti perché questi possano diventare dei tessuti a tutti gli effetti con determinate proprietà meccaniche e biologiche hanno bisogno di un periodo di maturazione in un liquido di cultura. Ciò rallenta notevolmente i tempi di produzione rendendone incompatibile l'applicazione su scala industriale e il conseguente abbattimento dei costi. L'obiettivo è di conciliare la qualità delle prestazioni biomeccaniche e fisiologiche del prodotto con le tecnologie industriali a disposizione e le leggi di mercato.

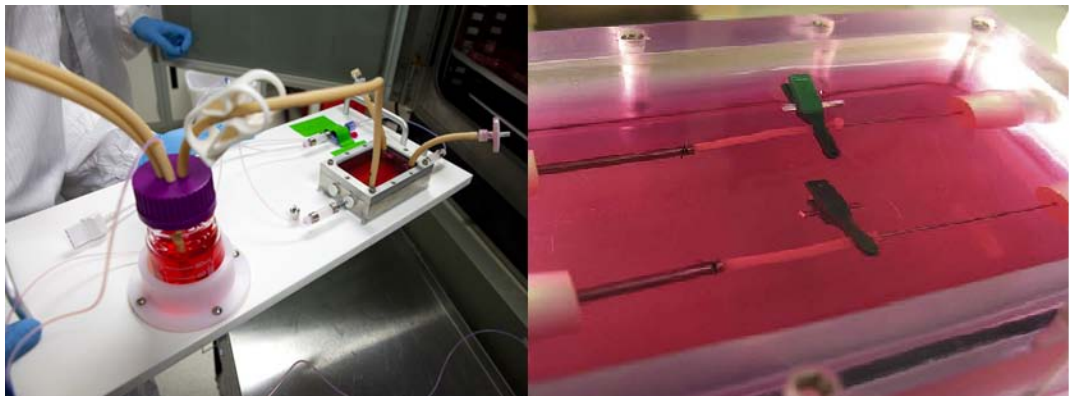


Figura 1.4: struttura bioreattore

2. TECNICHE E STRUMENTI

2.1 Stampante

Uno degli elementi fondamentali che sta alla base dell'idea stessa del bioprinting è l'utilizzo di una stampante come mezzo per arrivare al risultato finale. Data la relativa giovinezza di questa tecnica, finora si sono solo sviluppati acerbi prototipi o utilizzate, adattandole, stampanti ink-jet già in commercio. Non è ancora disponibile una stampante ideata appositamente per il bioprinting. Solo l'anno prossimo l'azienda californiana Organovo, in collaborazione con l'australiana Invetech, rilascerà sul mercato una stampante progettata esclusivamente per questa tecnica [10], aprendo così la strada verso la produzione industriale di questo strumento fondamentale per l'evoluzione del bioprinting (Figura 2.1).

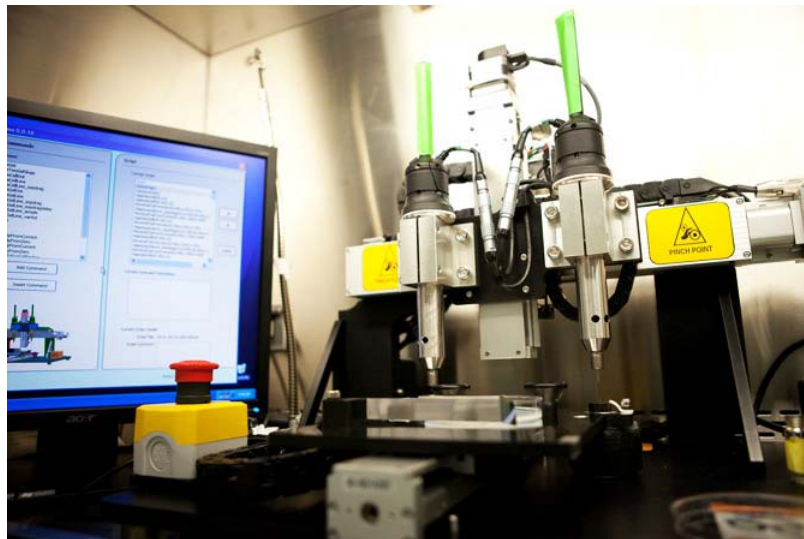


Figura 2.1: la stampante realizzata da Organovo e Invetech.

Oltre allo sviluppo di stampanti dedicate, di fondamentale importanza è la progettazione di software specifici che le comandano. Infatti la regolazione dei

parametri, come la quantità di cellule depositate o la pressione alla quale sono sottoposte le cellule contenute nelle singole gocce durante la fuoriuscita dagli ugelli, determina l'esito positivo o negativo della stampa.

2.2 Struttura stampante [11]

Fra la moltitudine di stampanti ink-jet presenti sul mercato, sono state scelte prevalentemente modelli della Hewlett Packard e della Canon. In particolare la serie HP500 è quella più gettonata per le sue caratteristiche. Oltre alla stampante in sé, molto importante è la cartuccia dell'inchiostro. Anche in questo caso quella più utilizzata è un prodotto del HP (HP26).

Si può suddividere il complesso di stampa in tre parti: *cell delivery system*, *motion system*, *control hardware and software*.

2.2.1 Cell delivery system [9,11]

Consiste nel sistema che contiene e distribuisce le cellule, ossia la cartuccia. La cartuccia ink-jet HP26 è preferita ad altre per la comprovata affidabilità nella stampa di vari tipi di cellule. Inoltre è facilmente smontabile e quindi pulibile accuratamente, processo fondamentale quando si sostituisce al normale inchiostro il bioink. Una delle più importanti caratteristiche di questa cartuccia è l'adeguato numero di ugelli e le loro dimensioni per l'applicazione nel bioprinting. Altro aspetto da non sottovalutare è la facile reperibilità data la loro ampia diffusione. La cartuccia è formata da una camera contenente l'inchiostro, una testina di stampa dove sono posizionati gli ugelli e una connessione elettrica sul retro. Gli ugelli hanno un diametro di 50 μm e sono organizzati in due colonne di 25 ugelli ciascuna. Queste caratteristiche permettono una risoluzione verticale di stampa di 300 dpi, definita come lo spazio (84.7 μm) tra un ugello e il successivo nella parallela colonna (Figura 2.2.1).

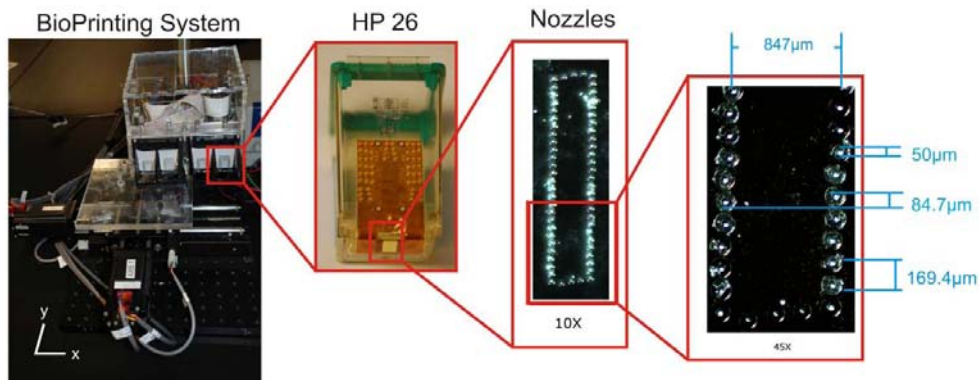


Figura 2.2.1: struttura cartuccia HP26.

Le successive generazioni di cartucce, che presentano risoluzioni più elevate poiché impiegano ugelli con diametri minori e più ravvicinati tra loro, non possono essere impiegate per il bioprinting poiché queste caratteristiche potrebbero arrecare danni alle cellule durante il processo di stampa a causa delle maggiori tensioni di taglio (*shear forces*) che si vengono a creare durante l'eiezione dagli ugelli.

La cartuccia presente nell'HP520C che distribuisce 3600 gocce per ugello al secondo consente una sufficiente velocità di stampa. Supponendo, infatti, che in ogni goccia di bioink ci sia una cellula, in poco meno di un minuto può essere deposta una quantità clinicamente significativa pari a dieci milioni di cellule.

L'HP26 è una cartuccia ink-jet termica, ciò vuol dire che ogni singolo ugello contiene una resistenza da 30Ω che viene riscaldata da una tensione impulsiva costante. L'aumento della temperatura provoca l'evaporazione dell'inchiostro adiacente la resistenza formando una bolla che espandendosi fa espellere la goccia di liquido dall'ugello, tutto in meno di $3\mu s$ (figura 2.2.2).

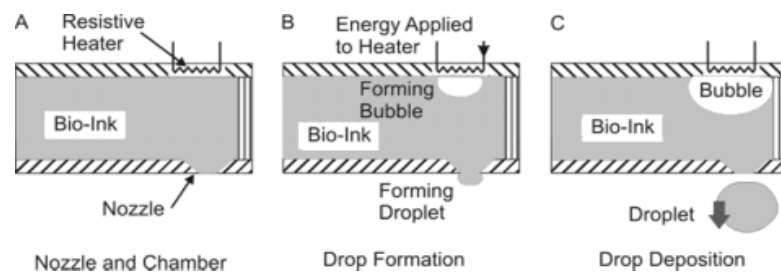


Figura 2.2.2: processo di deposizione termico.

È possibile configurare l'attivazione dei 50 ugelli interconnessi tra loro così da depositare il liquido in modo personalizzato e preciso. L'energia impressa alla singola goccia e il tempo di apertura degli ugelli è controllato attraverso il software.

2.2.2 Motion system [11]

Il sistema di distribuzione è tenuto in una posizione fissa sopra il piano di stampa che invece al contrario si muove sul piano orizzontale. Questo grazie al fatto che è collegato a una piattaforma mossa da un motorino elettrico capace di incrementi molto piccoli ($0.992 \mu\text{m}$) nelle direzioni dei due assi orizzontali. Il movimento del piano è sincronizzato con il sistema di distribuzione tramite un segnale di trigger esterno. La velocità di movimento dei singoli assi è nell'ordine dei 10 m/s anche se in futuro ci si propone di incrementarla.

2.2.3 Control hardware and software [11]

Le due componenti precedenti sono controllate, attraverso un PC, da un programma basato su MATLAB 7® (Mathworks Inc.). Questo sistema di controllo real-time, capace di un campionamento a più di 20 kHz, in questo campo di applicazione è usato a 1 kHz corrispondente a circa 3600 gocce al secondo. In particolare il software controlla la durata degli impulsi e l'intervallo tra un impulso e l'altro.

In input il software accetta, come traccia da ricreare tramite la stampa, sia immagini binarie che immagini a 16 livelli di grigio. L'immagine viene divisa in sezioni da 50 pixel (circa 4.2 mm) ciascuna e ogni sezione viene stampata in un singolo passaggio.

Se si impiegano due o più cartucce bisogna settarne la sincronizzazione tramite delle stampe di prova per verificare l'allineamento ed eventualmente compensare l'offset tra le due cartucce.

2.3 Limitazioni nella stampa

L'impiego di stampanti non ideate appositamente per la tecnica del bioprinting comporta delle problematiche aggiuntive.

2.3.1 Aggregazione cellulare e salt scaling [9]

Problemi di natura tecnica che possono presentarsi sono l'ostruzione degli ugelli e il *salt scaling*. L'aggregazione tra le cellule e le sostanze di complemento del bioink possono occludere gli ugelli della cartuccia. Ciò non permette un'adeguata precisione e continuità di stampa. Il salt scaling invece è indipendente dalla componente cellulare del bioink ma è un inconveniente comune agli inchiostri con componenti saline, impiegati in questa tecnica di stampa. Infatti, a causa del riscaldamento della soluzione la componente fluida evapora lasciando depositi salini sulla testina di stampa, occludendo gli ugelli. Viene compromessa quindi sia la fluidità dell'inchiostro che la formazione della goccia stessa provocando un degrado della qualità della stampa e la completa ostruzione degli ugelli.

Questi inconvenienti si verificano dopo un tempo non sufficiente per completare la stampa di una quantità clinicamente rilevante di cellule. Si è costretti quindi a smontare la cartuccia pulirla dalle ostruzioni e riprendere la procedura.

Un gruppo di ricercatori americani ha proposto come soluzione per queste due problematiche, l'impiego di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) come medium di cultura del bioink: ciò permette di arrivare a depositare almeno un milione di cellule prima che si possano verificare inconvenienti. La scelta dell'EDTA è sostenuta dal fatto che, oltre ad essere un agente chelante (ha la capacità di legare a se e catturare ioni di calcio, magnesio, rame, zinco e molti altri), il suo utilizzo in culture cellulari è comprovato dal già diffuso uso clinico. Anche in questa ricerca è stata usata una stampante HP520C con delle cartucce HP26. Sono state testate tre diverse concentrazioni di EDTA rispettivamente pari a 0.27, 0.53 e 1.06 mM per trovare quella che permette di ottenere i risultati migliori.

Una soluzione senza l'aggiunta di EDTA provoca la chiusura degli ugelli in meno di un minuto, mentre l'obiettivo di questo test era di arrivare a 25 minuti continui di stampa senza blocchi e/o errori.

Dai risultati del test si evince che le concentrazioni di EDTA che permettono la stampa del maggior numero di cellule sono 0,53 e 1,06 mM (Figura 2.3.1).

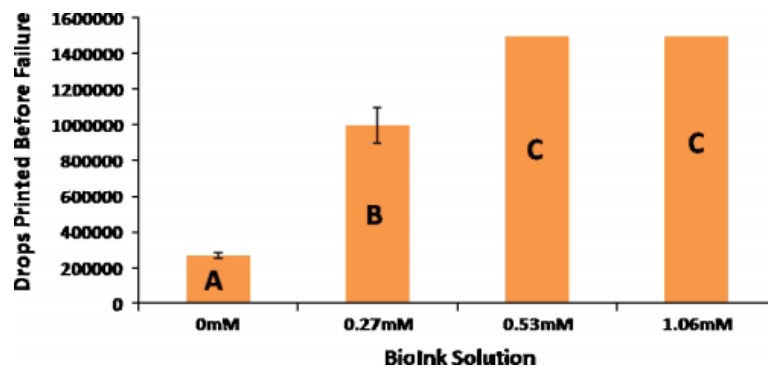


Figura 2.3.1: numero di cellule deposte a varie concentrazioni di EDTA.

Per valutare la qualità degli spruzzi di bioink vengono assegnati dei valori numerici ai singoli punti:

- 1: il punto di stampa è ben definito

- 0.5: un punto presenta degli schizzi (*spatter*) indice di un'iniziale occlusione degli ugelli (Figura 2.3.2)
- 0: non viene stampato niente

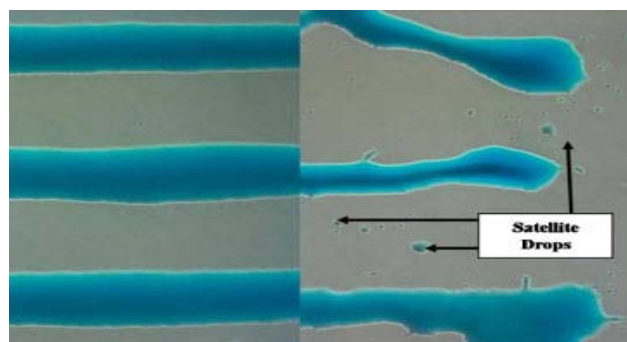


Figura 2.3.2: a sinistra linee senza *spatter*, a destra linee con *spatter* dopo 30 secondi di stampa.

Per verificare se l'EDTA impedisce efficacemente l'aggregazione cellulare prima della stampa, vengono stabiliti dei parametri di confronto: se vengono deposte gocce composte da una fino a tre cellule, l'aggiunta dell'EDTA è ritenuta efficace, se invece non viene stampata nessuna cellula oppure più di tre vuol dire che non lo è. Il miglior risultato è stato ottenuto con una concentrazione di 0.53 mM di EDTA (Tabella 2.3.3).

Un altro importante parametro è il LIVE/DEAD assay, ossia la verifica che la presenza di EDTA non comporti una morte cellulare superiore a quella che si verificherebbe in sua assenza. I risultati rassicurano che il numero di cellule necrotiche è assolutamente trascurabile. Inoltre l'aggiunta di EDTA alla sospensione cellulare non modifica la viscosità della soluzione, uno dei parametri fondamentali per la corretta riuscita della stampa.

Solution	Success	Failure
0 mM EDTA	197/375 = 0.53	178/375 = 0.47
0.27 mM EDTA	201/375 = 0.54	174/375 = 0.46
0.53 mM EDTA	228/375 = 0.61	147/375 = 0.39
1.06 mM EDTA	224/375 = 0.60	151/375 = 0.40

Success was defined as 1, 2 or 3 cells/drop, while failure was defined as 0 cells or >3 cells/drop.

Tabella 2.3.3: successi e insuccessi a varie concentrazioni EDTA.

In definitiva quindi questo test dimostra come l'aggiunta di una quantità di EDTA alla concentrazione di 0.53 mM alla soluzione cellulare prevenga l'aggregazione cellulare e il salt scaling permettendo così continuità e buona qualità di stampa maggiore.

2.3.2 Cell damage [12]

Si è già accennato a come l'eccessiva pressione usata per espellere le gocce, le variazioni di temperatura dovute alle resistenze o l'impiego di ugelli troppo piccoli possano provocare danno o morte delle cellule. Questa eventualità non è contemplabile in una tecnica che si prefigge l'obiettivo di formare tessuti "vitali".

Uno studio condotto alla Clemson University della South Carolina, vuole dimostrare che rispettando i parametri ottimali, il bioprinting permette di preservare le cellule e non alterarne le proprietà.

Attraverso l'impiego di cellule di ovaia di criceto cinese si vuole valutare la *cell viability*, l'apoptosi cellulare e i possibili danni alla membrana.

La *cell viability* è definita come il rapporto tra il numero di cellule vive e la somma delle cellule vive e morte. Dodici ore dopo il processo di stampa le cellule vive vengono evidenziate con un marcatore verde, mentre quelle morte con uno rosso. Tramite poi un microscopio vengono contate le cellule vive e quelle morte calcolando così la *cell viability*. Il test viene ripetuto con varie concentrazioni di cellule per trovare quella ideale. I risultati dimostrano che

non c'è una significativa differenza tra le varie concentrazioni e tutte presentano vitalità mediamente pari all'89%, quindi molto elevata (Figura 2.3.4).

L'apoptosi invece è definita come morte cellulare programmata e contribuisce al mantenimento del numero di cellule di un organismo. Quindi è un processo che normalmente avviene nei nostri tessuti ma qui si vuole valutare se il bioprinting possa alterarlo. Anche in questo caso le cellule apoptotiche vengono marcate di verde e la media apoptotica è calcolata dividendo il numero di cellule apoptotiche per il numero totale di cellule. I risultati mostrano che per le cellule sottoposte al processo di stampa la media è di $3.5 \pm 1.3\%$ e di $3.2 \pm 1.6\%$ per quelle non sottoposte. Quindi si è verificato che non vi è una sostanziale differenza, confermando ancora una volta che il bioprinting è un procedimento che preserva le proprietà delle cellule.

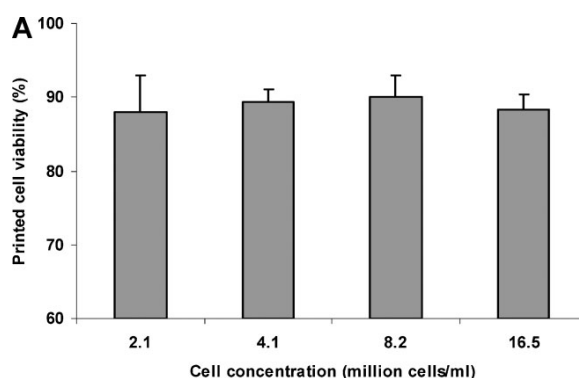


Figura 2.3.4: cell viability a varie concentrazioni.

Sono stati inoltre condotti dei test sul possibile danno della membrana. Si è visto che i pori che si venivano a creare nella membrana subito dopo la stampa, di diametro pari a 105 \AA , venivano richiusi in meno di due ore dalla cellula stessa (Figura 2.3.5). Questo studio quindi dimostra la sicurezza del processo di stampa per quanto riguarda l'integrità delle cellule.

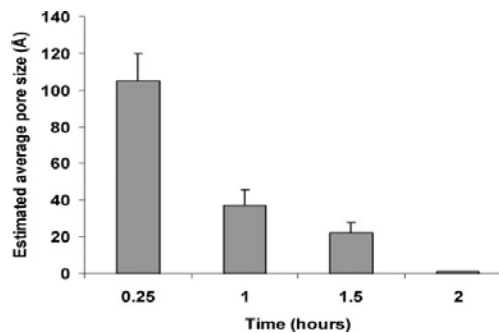


Figura 2.3.5: diametro dei pori sulla membrana cellulare in funzione del tempo.

2.4 Maturogenetic factors [3]

Come detto nell'introduzione, uno degli aspetti fondamentali di questa tecnica e in generale del tissue engineering, è la velocità con cui i tessuti appena prodotti raggiungono la maturazione sufficiente per poter essere impiantati.

Nello studio condotto da V. Mironov e la sua equipe nei laboratori della Medical University of South Carolina, sono stati testati due aspetti della maturazione: lo sviluppo delle sfere di tessuto stampate e la fusione delle stesse per formare una struttura compatta. Le soluzioni di test sono state incubate con un fattore di crescita noto (TGF β 1) e un possibile candidato (serotonina) ed è stato fatto il raffronto tra la crescita delle sfere trattate rispetto quelle non trattate. Dopo sette giorni di incubazione con i citati fattori di crescita sono state messe in contatto coppie di sfere (controllo-controllo, controllo-TGF β 1 e controllo-serotonina) per verificarne la fusione in termini di sovrapposizione. Le sfere di controllo sono state marcate in rosso mentre quelle trattate in verde (Figura 2.4.1). I risultati mostrano come a dispetto di una sovrapposizione solo del 10% tra le sfere di controllo, impiegando sfere trattate con i fattori di crescita la sovrapposizione sale fino al 40%. Inoltre il tessuto trattato mostra una maggior sintesi del collagene rispetto a quello di controllo. La misura della sovrapposizione è un parametro facilmente verificabile ma allo stesso attendibile per valutare la maturazione e fusione delle sfere.

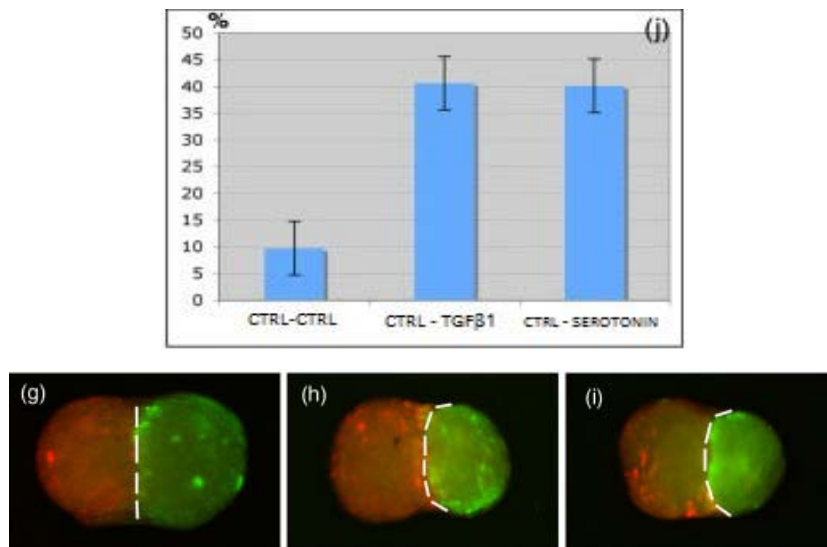


Figura 2.4.1: (j) % sovrapposizione sfere per vari fattori, (g) fusione CTRL-CTRL, (h) fusione CTRL-TGFβ1, (i) fusione CTRL-Serotonina (CTRL = controllo).

Questa ricerca ha quindi presentato un metodo più veloce ed economico del tradizionale basato sul bioreattore e ha consacrato la serotonina come fattore di crescita efficiente oltre che economico e non tossico. Quindi per un possibile cocktail di fattori acceleranti la maturazione, sia TGFβ1 sia la serotonina possono essere dei validi candidati.

2.5 Pulizia cartucce

Attualmente per il bioprinting vengono usate comuni cartucce che si possono reperire nei negozi. Poiché vengono impiegate per trattare fluidi biologici e spesso operano in ambienti sterili, anche la loro pulizia e sterilizzazione è un fattore che richiede attenzione. Dopo che la cartuccia è stata aperta, l'inchiostro viene aspirato e la testina di stampa viene sterilizzata [9]. Si tratta la stampante con i raggi UV mentre la cartuccia viene cosparsa di etanolo prima di riempirla con il bioink [12]. Dopo ogni sessione di stampa la cartuccia viene ripulita usando una combinazione di bagni chimici e ultrasuoni. Questo trattamento libera gli eventuali ugelli ostruiti ed elimina l'eventuale formazione

di salt scaling. La cartuccia viene poi risciacquata con acqua distillata e sottoposta all'azione di una soluzione contenete ruggine chimica. Risciacquata ancora una volta in acqua distillata e sottoposta all'azione di ultrasuoni, la cartuccia è poi pronta per essere riempita nuovamente [9].

3. MATERIALI

3.1 Biomateriali

Nel campo della bioingegneria e del tissue engineering, oltre agli strumenti e alle tecniche utilizzate, sono di fondamentale importanza i materiali impiegati. I materiali tradizionali non sono adatti poiché, operando in ambito biologico, sono richieste caratteristiche peculiari. Per questo motivo si utilizzano i biomateriali, ossia sostanze con cui costruire strutture capaci di sostituire una parte vivente originaria del corpo umano [1]. Una definizione di biomateriale più rigorosa e universalmente accettata è:

“materiali sintetici per un uso prolungato a contatto con mezzi biologici, che minimizzano le eventuali reazioni avverse da parte dell’organismo” [1]

Data l’eterogeneità e la vastità dei biomateriali è opportuno dividerli in sottocategorie.

Una prima distinzione generale si può fare tra biomateriali metallici e non metallici. Nel prosieguo della discussione i biomateriali metallici saranno tralasciati poiché nell’ambito del tissue engineering e in particolare del bioprinting non vengono contemplati. I biomateriali non metallici si possono suddividere in organici e non organici, tra i primi i più importanti sono i polimeri mentre tra i materiali non organici sono da ricordare le ceramiche e i vetri. Fra tutti, i materiali maggiormente impiegati sono i polimeri (il 45% di tutti i biomateriali), cui seguono i biomateriali metallici (30%) [1]. I materiali polimerici, grazie alla loro maggior somiglianza con i tessuti corporei, sono gli unici ad essere impiegati nel tissue engineering. Sono impiegati in particolare nella costruzione di supporti (*scaffold*) dove vengono impiantate le cellule in

attesa che si organizzino e si fondano tra loro creando così il tessuto voluto. Con l'avvento del bioprinting si sta cercando di sostituire i tradizionali biomateriali con materiali "vivi", costituiti per lo più da cellule. La comunità scientifica dovrà quindi accettare sempre più che questi "living tissue blocks" siano considerati biomateriali a tutti gli effetti, anche se esulano dalla tradizionale definizione [5,8].

3.2 Proprietà

I biomateriali devono sottostare a precise restrizioni, cercando di conciliare la compatibilità con l'ambiente biologico e le prestazioni in termini meccanici e fisici.

3.2.1 Materiali biocompatibili [1,2]

La biocompatibilità è il fattore discriminante tra un biomateriale e un materiale. L'impiego di un biomateriale è legato alla necessità di migliorare e/o ripristinare una determinata funzione biologica e quindi non può interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo con cui viene in contatto, altrimenti verrebbe meno al suo scopo. La richiesta di minimo è, quindi, che non sia biotossico.

3.2.2 Materiali biodegradabili [1]

Ogni materiale impiantato provoca una reazione da parte dell'organismo e viceversa subisce un attacco dallo stesso. I materiali possono essere divisi quindi in biostabili e biodegradabili. I primi resistono all'azione dell'ambiente biologico preservando le proprie caratteristiche come i biomateriali metallici. I materiali biodegradabili subiscono invece una progressiva demolizione o trasformazione chimica in conseguenza di specifiche azioni da parte dell'organismo. I residui provocati dalla degradazione del materiale stesso

possono produrre reazioni infiammatorie indesiderate, possibile inconveniente dei materiali biodegradabili. I materiali polimerici sono generalmente biodegradabili.

3.2.3 Materiali bioattivi [1]

Un'ulteriore caratteristica dei biomateriali è la bioattività che sta ad indicare la capacità del materiale di indurre nell'organismo una specifica attività biologica. Questo tipo di materiali permette la formazione di legami biochimici e di interazioni dirette con il tessuto biologico, il quale può crescere liberamente sulla superficie. Tutto ciò permette l'instaurarsi di un solido legame, dal punto di vista meccanico, tra il tessuto naturale e l'impianto protesico.

3.2.4 Materiali bioriassorbibili [1,2]

I materiali bioriassorbibili sono invece quei materiali che subiscono una progressiva degradazione a contatto con l'organismo. A differenza dei biodegradabili il riassorbimento è predeterminato e voluto. I materiali bioriassorbibili che compongono l'impalcatura per la crescita del tessuto, devono avere un tempo di degradazione strettamente sincronizzato con quello della formazione del tessuto: il riassorbimento troppo rapido della matrice non permette la formazione di un tessuto completo e robusto. Tempi troppo lunghi, al contrario inducono la formazione di tessuto attorno allo scaffold in modo imperfetto o incompleto.

I materiali bioriassorbibili sono biodegradabili e possono essere anche bioattivi.

3.2.5 Proprietà meccaniche [2]

Anche le proprietà meccaniche dei biomateriali sono di fondamentale importanza per il successo dell'impianto. Infatti i materiali impiegati devono mostrare caratteristiche meccaniche (moduli elastici, risposte a forze applicate)

analoghe e compatibili con quelle del tessuto sostituito. Ad esempio gli scaffold, largamente usati nel tissue engineering, devono avere una sufficiente resistenza meccanica durante la coltura *in vitro* per mantenere gli spazi richiesti per la crescita cellulare. La degradazione degli scaffold deve essere regolata opportunamente in modo che conservi un'integrità strutturale adeguata per un tempo sufficiente affinché il tessuto da poco sviluppatosi possa sostituirne la funzione di sostegno.

3.3 Biomateriali di sintesi e naturali

Finora abbiamo parlato soprattutto dei biomateriali polimerici che sono i materiali più usati nel campo dell'ingegneria dei tessuti. Bisogna fare però un'ulteriore distinzione tra materiali di sintesi e materiali naturali.

3.3.1 Biomateriali di sintesi

I materiali sintetici hanno due significativi vantaggi: possono essere riprodotti industrialmente su ampia scala e permettono un preciso controllo di alcuni parametri come ad esempio peso molecolare, tempi di degradazione, forma e porosità della struttura. Il principale svantaggio dei materiali sintetici è la mancanza di specifici segnali per consentire il riconoscimento cellulare e questo provoca talvolta un'interazione indesiderata con l'ambiente biologico.

I materiali polimerici sintetici più usati nel tissue engineering sono i poliesteri biodegradabili:

- Policaprolattone (PCL) [2]: è uno dei biomateriali di nuova concezione di maggiore diffusione nel settore dell'ingegneria tessutale. Usato inizialmente per la realizzazione di film degradabili e di stampi, oggi trova largo impiego in vari settori quali la realizzazione di suture riassorbibili, il *drug delivery* per sistemi a rilascio controllato di farmaci e

per la *tissue regeneration* per la realizzazione di sistemi sostitutivi del tessuto osseo naturale. Il policaprolattone (PCL) è un poliesteri alifatico lineare (Figura 3.3.1). La caratteristica più importante dal punto di vista chimico, è la sua capacità di degradarsi in ambiente fisiologico dovuta alla facile interazione che il legame estere alifatico, presente lungo la catena principale, mostra con le molecole di acqua.

- Acido poliglicolico (PGA) [1,2]: è un polimero altamente cristallino e per questo non è solubile in molti solventi organici (Figura 3.3.1). A causa della sua natura idrofilica, il PGA tende a perdere la sua resistenza meccanica rapidamente, il 50% in due settimane, e viene riassorbito circa 4 settimane dopo l'impianto. Per queste sue caratteristiche è usato in particolare come materiale di sutura.
- Acido Polilattico (PLA) [1,2]: sebbene strutturalmente sia molto simile al PGA, il PLA differisce da quest'ultimo per le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche a causa della presenza di un gruppo metile in corrispondenza del carbonio α (Figura 3.3.1). Quindi a causa della sua maggiore idrofobicità, la sua idrolisi è più lenta rispetto a quella del PGA. Sia il PGA che il PLA sono stati impiegati anche nella fabbricazione di chiodi, viti, placche per impianti ortopedici e per sistemi di rilascio controllato di farmaci.

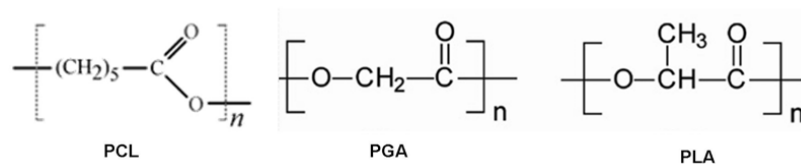


Figura 3.3.1: struttura chimica di PCL, PGA, PLA.

3.3.2 Biomateriali naturali

Per superare le limitazioni dei materiali sintetici, soprattutto in questi ultimi anni, si è cercato di impiegare materiali naturali. Questi ultimi, infatti, hanno il

vantaggio di contenere nella loro struttura sequenze segnale atte a promuovere l'adesione delle cellule e mantenerne le funzioni (il cosiddetto "riconoscimento cellulare") [1,2]. Questa proprietà è dovuta al fatto che si tratta di sostanze già presenti nell'organismo umano. In particolare sono gli elementi che formano la matrice extracellulare (ECM), la quale insieme alle cellule, forma i tessuti biologici. La tecnica più diffusa prevede di prelevare tali materiali da tessuti umani o animali che, però, non sono disponibili in grandi quantità e possono essere veicolo di agenti patogeni. Dal punto di vista meccanico non presentano una sufficiente resistenza, escludendone così l'uso per la produzione di alcuni tipi di scaffold [2]. Il bioprinting potrebbe risolvere, almeno in parte, queste limitazioni. Infatti, poiché impiega solo sostanze naturali, conserva i vantaggi di compatibilità e di integrazione di questo tipo di biomateriali, ma allo stesso tempo ne permette una produzione maggiore e indipendente dalla donazione di tessuti o da complicati prelievi autologhi. Inoltre, grazie all'elevata "personalizzazione" nella produzione, il bioprinting consente di ottenere strutture perfettamente adeguate alle esigenze richieste, sia dal punto di vista della configurazione che delle proprietà meccaniche.

I materiali naturali più ampiamente impiegati sono:

- Collagene [1,2]: è un componente naturale della matrice extracellulare di molti tessuti connettivi, quali ossa, pelle, tendini e legamenti; svolge funzioni di supporto e collegamento. Rappresenta circa il 25% di tutte le proteine del corpo umano e ne esistono oltre 25 tipi. È costituito da catene polipeptidiche, catene α , strettamente intrecciate tra loro così da formare una superelica compatta. Questi filamenti si organizzano poi in una struttura quaternaria che prende il nome di tropocollagene (Figura 3.3.2.C); quest'ultimo si associa in file parallele sfalsate (Figura 3.3.2.B). Questa configurazione e i legami che si vengono a creare, garantiscono alle fibre un'alta resistenza alla trazione.

Il collagene è costituito da sequenze di amminoacidi (principalmente glicina, prolina e idrossiprolina). Il collagene viene utilizzato come supporto per la rigenerazione dei tessuti poiché agevola la proliferazione e il metabolismo cellulare. Tuttavia, è difficile regolarne la biodegradabilità e le proprietà meccaniche.

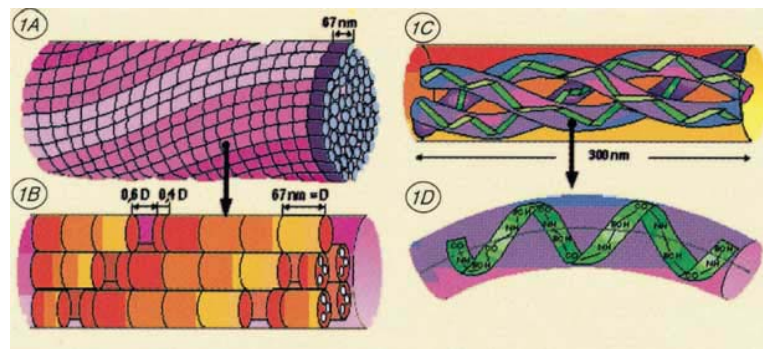


Figura 3.3.2: (A) Fibra di collagene: costituita da microfibre. (B) Microfibrilla: composta, in media, da 5 molecole di collagene. (C) Molecola di tropocollagene composta dall'avvolgimento di 3 catene, avvolte in tripla elica (struttura quaternaria). (D) Catena di polipeptidi arrotolata in elica sinistrorsa (struttura terziaria).

- Acido ialuronico [1,2]: è uno dei più abbondanti glicosamminoglicani (GAGs) dell'organismo umano. È un polisaccaride lineare composto da unità ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil glucosammina (Figura 3.3.3). E' presente nella matrice extracellulare di tutti i tessuti molli (cartilagine, pelle, tendini, ...) e svolge un ruolo importante in diversi processi biologici come nel liquido sinoviale dove ha una funzione lubrificante.

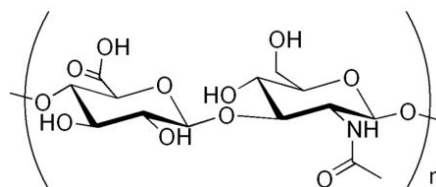


Figura 3.3.3: struttura chimica acido ialuronico.

3.4 Bioink

Con bioink si intende un materiale allo stato semiliquido, formato da una parte cellulare e opportuni elementi di complemento. Questo nome deriva dal fatto che, come le gocce di inchiostro delle comuni stampanti inkjet, le gocce di bioink cominciano a fondersi tra loro subito dopo essere state deposte (Figura 3.4). Tramite questo rivoluzionario “inchiostro”, impiegato nel processo di stampa esposto nel Capitolo 2, si ottengono elementi dalla struttura desiderata in maniera altamente precisa. Il processo di produzione del bioink si divide in due parti poiché la componente cellulare va trattata separatamente: *cell culture*, e la preparazione del bioink vero e proprio.

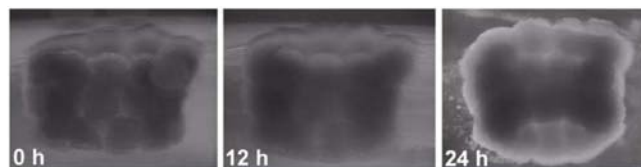


Figura 3.4: fusione delle cellule dopo 0, 12, 24 h.

3.4.1 Cell culture

Per ricreare i vari tipi di tessuti, vi sarà bisogno di differenti bioink, ognuno contenente il tipo di cellule di cui il tessuto è composto. Il procedimento con cui la maggior parte delle cellule viene trattata prevede, come prima cosa, che vengano poste in coltura con un MCDB (Molecular, Cellular, and Developmental Biology) [13]. Ogni MCDB è un mezzo di coltura realizzato per fornire un ambiente nutritivo perfettamente bilanciato che promuova selettivamente la crescita di specifici tipi di cellule. Il Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) è quello maggiormente impiegato [3,9,12,14]. Come integrazioni a questo liquido di coltura, vengono aggiunte il 10% di siero di feto bovino (FBS) e/o di topo [3] e l’1% di antibiotici e antimicotici (e.g. penicillina, streptomina, gentamicina, ...) [3,9,12-14]. A seconda dei casi possono essere immessi nella

soluzione fattori di crescita [14], eparina (ha un effetto anticoagulante) [14], EDTA (previene il *salt scaling* e l'aggregazione cellulare prima della stampa) [9,14], L-glutammina [3,9,14], bicarbonato di sodio [9] e idrocortisone [14]. Questo composto viene poi incubato a 37°C per 10 giorni circa in un ambiente umidificato con una concentrazione di CO₂ del 5% [3,9,12,13,14]. Il medium di coltura viene cambiato ogni 48-72 ore.

3.4.2 Composizione bioink

Dopo i 10 giorni la sospensione cellulare viene centrifugata a 1000-1500 rpm per 5 minuti [12-14]. Una tecnica alternativa alla centrifugazione consiste nel filtrare la soluzione con un colino che lascia passare solo la parte liquida o al massimo elementi non superiori a 40 µm [9]. Queste operazioni permettono di eliminare la componente surnatante e tenere quindi la parte corpuscolare della soluzione. Quest'ultima viene posta in una soluzione salina (Dulbecco's phosphate-buffered saline solution (DPBS)[12,13] o Hank's balanced salt solution (HBSS) [9]) per ottenere la composizione finale del bioink [12]. La concentrazione cellulare nel bioink è compresa tra $1.6 \cdot 10^6$ e $20 \cdot 10^6$ cellule/ml [9,12].

3.5 Biopaper

Come la normale stampante ha bisogno di un foglio su cui stampare, così la *bioprinter* ha bisogno di un supporto dove deporre il bioink. Questo supporto prende il nome di *biopaper*, continuando così l'analogia con il mondo delle stampanti comuni. Si tratta cioè di una nuova concezione di scaffold, non più permanenti ma temporanei. Altro non è, quindi, che una superficie di supporto dove "impiantare" le cellule fintantoché non si sono fuse, moltiplicate e organizzate in un tessuto vero e proprio. Inoltre, perché queste operazioni possano avvenire, la biopaper deve favorirne un continuo e costante apporto di

sostanze nutritive e ossigeno alle cellule. Dal punto di vista strutturale solitamente è composta da idrogel che simulano l'ambiente cellulare (Figura 3.5.1).



Figura 3.5.1: esempio di idrogel usato come biopaper.

La biopaper si presenta in forma liquida ma dopo essere stata deposta, tramite lo stesso procedimento del bioink, passa a una consistenza solida-gelatinosa (Figura 3.5.2).



Figura 3.5.2: idrogel dopo 8 minuti (fase solida gelatinosa).

Vi è la possibilità di deporre contemporaneamente bioink e biopaper tramite due differenti cartucce, oppure seminare le cellule su uno strato di biopaper precedentemente stampato. A seconda delle cellule che si vogliono impiantare sono stati sviluppati vari tipi di biopaper.

4. Scaffold

4.1 Cos'è lo scaffold

La rigenerazione di tessuti richiede un supporto (scaffold), simile alla matrice extracellulare, che permetta alle cellule di organizzarsi in complesse strutture tridimensionali (figura 4.1). Le cellule isolate infatti, sono difficilmente in grado di organizzarsi in nuovi tessuti spontaneamente [2].

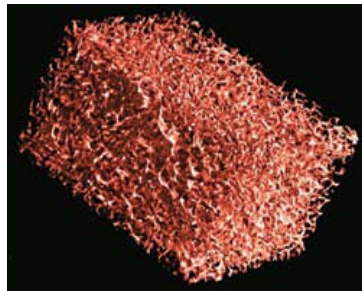


Figura 4.1: esempio di scaffold per il tissue engineering.

Nel tradizionale approccio del tissue engineering è previsto l'impiego di scaffold rigidi (approccio *top down*) ma sempre più, anche grazie al bioprinting, gli sforzi della comunità scientifica si stanno indirizzando verso un approccio *bottom up*. Questo procedimento prevede l'eliminazione o perlomeno un impiego ridotto (*scaffold-less*) dello scaffold. Un'innovativa caratteristica del bioprinting sta nell'utilizzo di scaffold temporanei e biorassorbibili (biopaper). Ciò consente di parlare più di *solid scaffold-free* che di *scaffold-less*. L'obiettivo più ambizioso che ci si prefigge per il prossimo futuro è quello di implementare una tecnica completamente *scaffold-free* [5].

4.2 Pro e contro

L'impiego di scaffold tradizionali presenta vantaggi e svantaggi.

I vantaggi principali sono di seguito esposti [8]:

- la necessità di un substrato dove le cellule possono aderire per proliferare;
- la conformazione porosa dello scaffold che rappresenta un ambiente di deposizione cellulare ideale;
- oltre alla funzione di adesione, il supporto permette la trasmissione di segnali per la migrazione e la differenziazione cellulare (attività tramite le quali le cellule di un organismo pluricellulare si ripartiscono i compiti);
- il tessuto in formazione deve avere una specifica struttura, spesso tridimensionale. Uno scaffold è quindi necessario per costruire e mantenere il tessuto con la struttura voluta;
- conferisce buone proprietà meccaniche all'impianto dovute alla rigidità e consistenza iniziale del supporto.

A dispetto di questi benefici, l'impiego di scaffold tradizionali presenta alcuni limiti [8]:

- la vascolarizzazione dei tessuti ingegnerizzati resta un problema determinante e tuttora irrisolto;
- la corretta e precisa deposizione delle cellule nella struttura porosa dello scaffold rimane di difficile realizzazione;
- è praticamente impossibile, con le tecniche tradizionali, ottenere tessuti formati da strati di diversa densità cellulare che simulino la complessità di una struttura multi-tessutale come può essere quella di un organo;
- la rigidità della matrice di supporto può interferire in alcuni casi con la differenziazione cellulare;
- il processo infiammatorio che interviene durante la degradazione dello scaffold biodegradabile non favorisce la crescita di un nuovo tessuto.

Per quasi vent'anni si è cercato di risolvere queste problematiche ma senza successo. Appare quindi chiaro come queste limitazioni siano intrinseche nell'impiego di scaffold rigidi come supporto alla crescita dei tessuti.

Un nuovo approccio, slegato dall'impiego dei tradizionali supporti, sembra quindi l'unica via percorribile affinché il tissue engineering superi queste limitazioni e possa affermarsi su larga scala [8].

4.3 Scaffold in poliuretano

4.3.1 Poliuretani di test [6]

I poliuretani (PUs) sono stati impiegati come biomateriali in molti casi grazie alla loro biocompatibilità e alle eccellenti proprietà meccaniche. La maggior parte dei PUs non è biodegradabile e perciò si possono creare a lungo termine delle reazioni indesiderate nell'ambiente con cui vengono a contatto. Sono stati quindi sviluppati dei poliuretani biodegradabili per superare queste limitazioni. È stato inoltre dimostrato che, aggiungendo un gruppo solfonico, i PUs biodegradabili mostrano una maggiore emocompatibilità oltre ad esibire un miglioramento delle proprietà fisiche come resistenza alla trazione, modulo elastico, viscosità della massa e comportamento in soluzione.

Si sono confrontate le proprietà dei poliuretani biodegradabili solfonici con quelle dei tradizionali PUs. È stata quindi condotta un'analisi sull'impiego di poliuretani biodegradabili solfonici come materiali per la produzione di scaffold tramite il bioprinting. Per ottenere dei polimeri pH-sensibili e con buone caratteristiche di resistenza, si è composto il poliuretano con:

- metilene 2-p-fenil-diisocianato (MDI) come *hard segment*. Si è usato il MDI poiché i PUs con questa sequenza mostrano eccellenti proprietà meccaniche;
- policaprolattone diolo (PCL-diolo), come *soft segment*, per le sue note proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità;

- N-bis (2-idrossietile)-2-acido ammino etano solfonico (BES) come *chain extender*. La catena BES trasforma i PUs in poliuretani pH-sensibili.

Si forma così il polimero finale MP530B (figura 4.3.1).

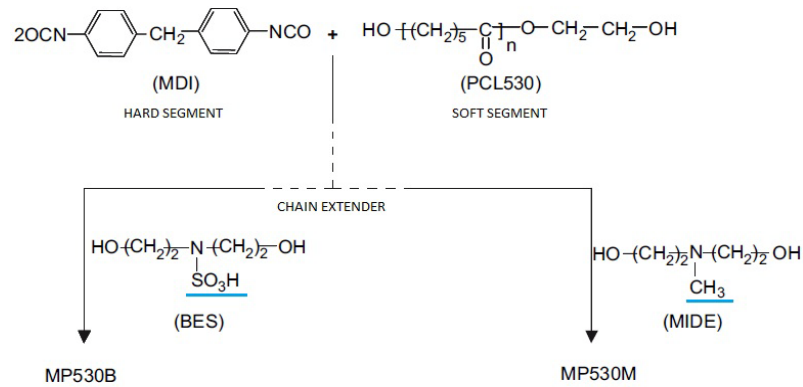


Figura 4.3.1: Struttura del MP530B e del MP530M.

Le proprietà di questo poliuretano sono comparate con l'MP530M, il quale ha come catena finale il gruppo MIDE (2,2-(metil ammino) dietanolo). È impiegato questo gruppo poiché ha caratteristiche simile al BES ma senza contenere acidi solfonici (figura 4.3.1).

4.3.2 Proprietà meccaniche [6]

Le proprietà elastomeriche (elasticità e deformabilità) dei poliuretani sono dovute alla separazione di fase tra il segmento morbido e quello duro della catena. Ciò è dovuto all'incompatibilità del soft segment (apolare) con quello hard (polare). Si sono comparate le proprietà di MP530B e MP530M relativamente a quelle del Tecoflex®, un poliuretano non biodegradabile disponibile in commercio (tabella 4.3.2).

Materials	Mechanical properties in percentage to Tecoflex SG60				GPC M_n (g/mol)	Swelling ratio at 48 h (%)
	Tensile strength (%)		Elongation (%)			
	Dry	Wet	Dry	Wet		
MP530B	59.1	11.3	52.7	109	162,000	4.71 ± 1.85
MP530M	9.6	3.5	26.8	73	66,000	11.01 ± 0.86

Tabella 4.3.2: proprietà meccaniche di MP530B e MP530M.

Dai risultati si evince che l'MP530B ha proprietà meccaniche nettamente migliori rispetto al MP530M. Questo è dovuto principalmente a due motivi:

- l'aggiunta dell'acido solfonico, grazie alla sua polarità, fa sì che si formino aggregati ionici. Questo porta all'aumento della polarità dell'hard segment fortificando l'interazione tra le catene del polimero;
- il minor peso molecolare del MP530M rispetto quello del MP530B ($M_n(\text{MP530M}) \approx 40\% M_n(\text{MP530B})$) diminuisce l'integrità della catena e le interazioni.

Sebbene inferiori di quelle del Tecoflex®, le proprietà meccaniche del MP530B sono compatibili con molte applicazioni nel tissue engineering.

4.3.3 Analisi della degradazione [6]

Per analizzare la degradazione dei materiali sono stati verificati e comparati vari parametri come il peso molecolare, la perdita della massa, il valore di pH e la conservazione della resistenza alla trazione. Per accelerare il processo di degradazione i test sono stati condotti *in vitro* in un ambiente a 67° C.

I risultati mostrano come il MP530B subisca una perdita inferiore di massa e peso molecolare rispetto al MP530M (figura 4.3.3 B). Ancora più significativa è la differenza per quanto riguarda la resistenza alla trazione: dopo 4 settimane, nel MP530B diminuisce del 15 % mentre nel MP530M addirittura dell'85 % (figura 4.3.3 A). Entrambi non subiscono una significativa variazione di pH: da 7.4 a 7.09 il MP530B e da 7.4 a 7.3 il MP530M.

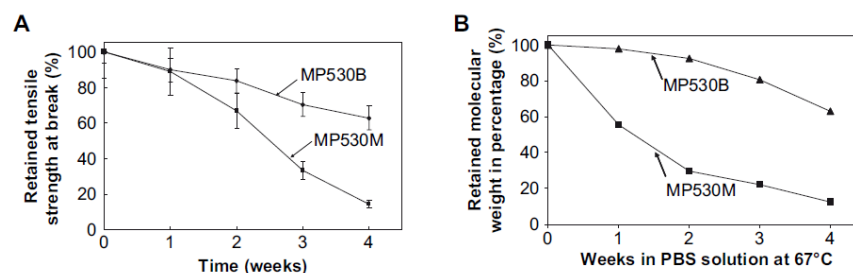


Figura 4.3.3: (A) resistenza alla trazione e (B) peso molecolare in funzione del tempo.

4.3.4 Analisi della citocompatibilità [6]

L'analisi della citocompatibilità permette di valutare l'adesione e la proliferazione che le cellule hanno sui materiali in esame. La proliferazione cellulare è da attribuire alle interazioni cellule-materiale. Per analizzare la citocompatibilità, in questo test sono usati fibroblasti depositi su MP530B, MP530M, Tecoflex® e dischi di Petri, gli ultimi due come controllo. I risultati mostrano come ci sia una maggior proliferazione sul MP530M e sui dischi di Petri (figura 4.3.4). La minor proliferazione sul MP530B è dovuta principalmente alla presenza di gruppi sulfonici carichi negativamente che respingono l'adesione dei fibroblasti.

Oltre che con i fibroblasti, il MP530B e il Tecoflex® presentano una scarsa adesione anche con le piastrine. Questa caratteristica è propria dei biomateriali emocompatibili, definiti tali se prevengono la formazione di tromboemboli in ambito cardiovascolare. Il Tecoflex® è stato usato per anni come biomateriale in applicazioni cardiovascolari e, poiché l'MP530B ha caratteristiche simili sia nell'elasticità che nella proprietà di antiadesione delle piastrine, è legittimo ipotizzare che l'MP530B possa trovare impiego nel tissue engineering cardiovascolare.

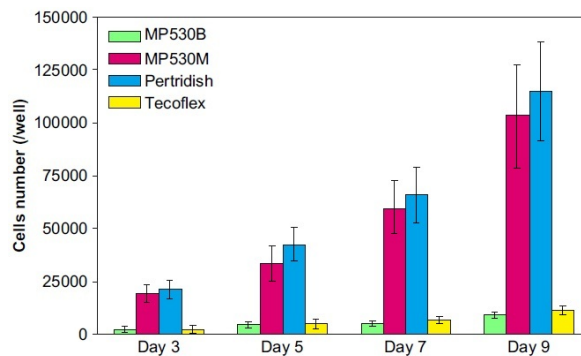


Figura 4.3.4: analisi quantitativa della proliferazione cellulare sui quattro materiali.

4.3.5 Conclusioni [6]

Il test finale consiste nella stampa, attraverso la tecnica del bioprinting, di una soluzione contenente il MP530B. Quest'ultimo è stato mescolato con una soluzione a pH basico (almeno pH 8.7) per mantenerne lo stato liquido, poiché a pH fisiologico si presenta allo stato solido. Questa caratteristica permette al MP530B di essere impiegato in soluzione come liquido di stampa nelle normali cartucce e trasformarsi in uno scaffold di adeguata consistenza una volta depositato. Dall'analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM), si può vedere come lo scaffold presenti una struttura porosa tridimensionale con macropori compresi tra 10 e 30 μm (figura 4.3.5 B) e micropori dell'ordine dei 100 nm (figura 4.3.5 C). Questi pori permettono un'ottimale penetrazione e proliferazione delle cellule e facilita il trasporto di sostanze nutritive e ossigeno alle cellule grazie alla fitta interconnessione.

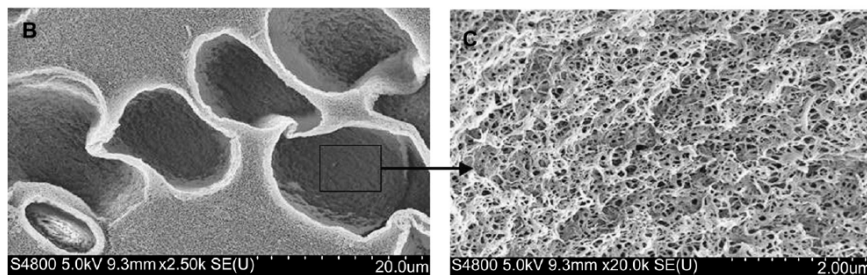


Figura 4.3.5: (B) struttura dei macropori, (C) struttura dei micropori.

4.4 Scaffold per il rilascio di fattori di crescita [15]

Per permettere alle cellule di proliferare, oltre alla presenza di uno scaffold, vi è la necessità di aggiungere dei fattori di crescita (GFs). Solitamente venivano usati dei GFs idrosolubili. Questi però diffondevano troppo rapidamente nel liquido di coltura, non permettendone la somministrazione e l'azione per un sufficiente periodo di tempo. Si palesa quindi la necessità di integrare nello scaffold un sistema per il rilascio controllato e graduale di GFs.

4.4.1 Materiali impiegati [15]

Per il rilascio graduale dei fattori di crescita, una matrice di fibrina intrisa di GFs viene integrata in uno scaffold di idrogel di collagene. Come materiale principale per la realizzazione dello scaffold, è stato scelto il collagene per le note proprietà di favorire l'adesione e la coltura cellulare. In particolare è stato impiegato il collagene di tipo I diluito, a tre diverse concentrazioni (1.74, 1.16, 0.87 mg/mL), in una soluzione che lo mantenga a pH acido (~ 4) per evitare che si formino aggregati prima della stampa. Per la sperimentazione sono state scelte cellule neuronali di topo (C17.2), trattate nel modo descritto nel paragrafo 3.4 per realizzare il bioink. La matrice di fibrina, uno degli idrogel più largamente impiegati, è stata creata dall'integrazione di soluzioni contenenti fibrinogeno, trombina e eparina. Poiché questi componenti, se mescolati insieme, formano un composto gelatinoso, vengono posti in cartucce separate. Come fattore di crescita è stato scelto il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) poiché gli effetti che ha sulla migrazione e proliferazione delle cellule C17.2 sono già stati dimostrati *in vitro*.

4.4.2 Procedura di stampa [15]

I vari componenti sono depositi sul disco di coltura seguendo un ordine prestabilito. La soluzione contenente fibrinogeno e il fattore di crescita VEGF

viene deposta a forma circolare per prima (figura 4.4.2 B). Le viene sovrapposta la soluzione contenente la trombina così da creare la matrice di fibrina (figura 4.4.2 C). Su un quadrato di collagene, posto a ricoprire la matrice (figura 4.4.2 D), vengono stampate le cellule C17.2 accanto alla matrice con il VEGF (figura 4.4.2 E). Viene poi posto un ulteriore quadrato di collagene per mantenere l'integrità della struttura durante il periodo di coltura (figura 4.4.2 F).

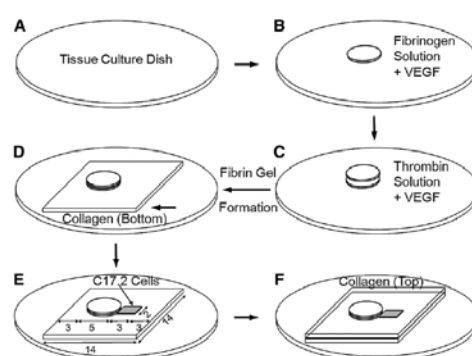


Figura 4.4.2: procedura di stampa layer-by-layer dello scaffold, della matrice di fibrina con VEGF e delle cellule C17.2.

4.4.3 Risultati [15]

Per prima cosa è stato condotto lo studio sulla *cell viability* che ha dimostrato come la tecnica di stampa non influenzi la viabilità cellulare (91.68 % cellule deposte tradizionalmente contro un 93.23 % di quelle stampate). Anche la differenza tra le tre concentrazioni di collagene dello scaffold non modifica significativamente la *cell viability*. Tra le tre concentrazioni quella che ha mostrato la maggior proliferazione cellulare è stata 1.74 mg/mL. È stato visto inoltre come dal punto di vista meccanico-strutturale l'intera struttura tridimensionale (l'altezza dello scaffold è nell'ordine di 500 μm) si sia mantenuta per tutta la durata del test, fornendo quindi garanzie anche sotto questo aspetto. Per verificare se la matrice contenente VEGF comportasse effettivamente dei miglioramenti sono state realizzate due condizioni di controllo: la prima dove la matrice di fibrina non conteneva GFs, l'altra dove il

VEGF era disperso nello scaffold senza la matrice. Il movimento delle cellule nello scaffold è stato valutato per tre giorni tramite la misura della migrazione attraverso il bordo (linea nera ondulata di figura 4.4.3) del gel di fibrina contenente VEGF (zona marcata con * a destra della linea nera di figura 4.4.3).

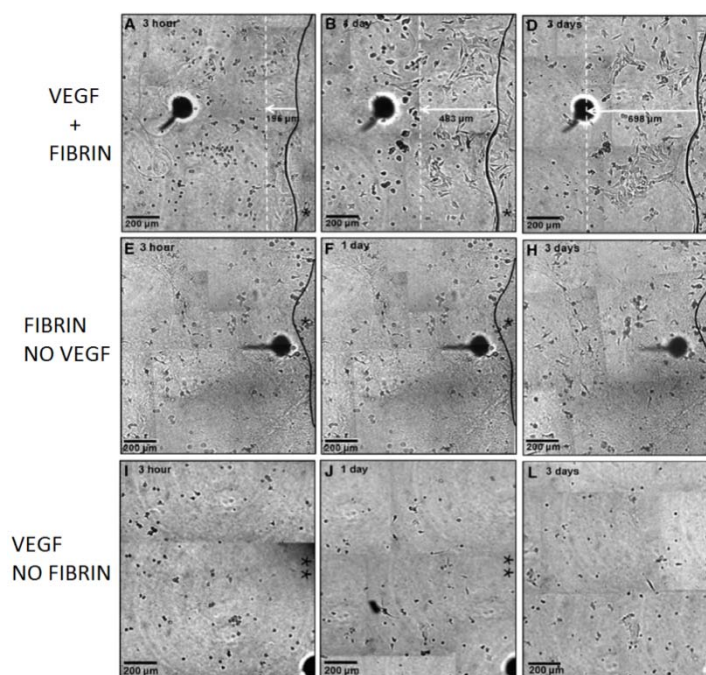


Figura 4.4.3: migrazione e proliferazione delle cellule in tre condizioni diverse e in tre intervalli di tempo.

Dopo appena un giorno le cellule cominciano a crescere e a cambiare forma (figura 4.4.3 A). A partire dal giorno 3 le cellule mostrano una decisa e frequente differenziazione (figura 4.4.3 D). Con il passare delle ore la migrazione delle cellule verso il punto nero (figura 4.4.3) che identifica la regione di interesse aumenta, allontanandosi dal bordo della matrice di 196 μm dopo tre ore fino a 698 μm dopo tre giorni. Inoltre le cellule mostrano la tendenza ad avvicinarsi tra loro e a formare aggregati. Nelle due situazioni di controllo (matrice senza VEGF e VEGF senza matrice) non si riscontrano né migrazione né proliferazione cellulare e addirittura nella seconda situazione le cellule cominciano a ridursi (figura 4.4.3 E-H, I-L).

Questi risultati provano come l'impiego di una matrice di fibrina, intrisa di GFs, inserita in uno scaffold sia in grado di rilasciare per un tempo prolungato i fattori di crescita necessari per lo sviluppo delle cellule seminate.

Rimane da regolare la corretta quantità di VEGF che deve essere rilasciata per unità di tempo e l'influenza che questo fattore di crescita ha su altri tipi di cellule diverse da quelle neuronali.

4.5 Scaffold 3D con canali integrati [16]

Una delle limitazioni degli scaffold attualmente utilizzati è l'impossibilità di fornire un costante e diffuso apporto di ossigeno, di fattori di crescita e di nutrimento alle cellule che vi vengono deposte. Nello studio condotto in collaborazione dai ricercatori del dipartimento di radiologia della Harvard Medical School (U.S.A) e del dipartimento di ingegneria neuronale dell'università di Daejeon (Corea del Sud), viene proposto un approccio che prevede la realizzazione di uno scaffold multistrato di idrogel che integra micro canali.

4.5.1 Procedura di stampa [16]

Grazie alla tecnica *freeform fabrication* (FF) è possibile ripetere la deposizione di materiale strato per strato (*layer-by-layer*), generando un blocco in 3D di collagene di tipo I con canali integrati. I canali sono inizialmente riempiti di gelatina che viene usata come materiale sacrificale e successivamente è rimossa non appena l'intera struttura sia stata stampata. Viene impiegata una gelatina termosensibile così che riscaldando a circa 40° C per 10 minuti lo scaffold, si scioglie ed esce dallo scaffold, lasciando i canali vuoti. La tecnica di stampa è quella, più volte spiegata, adottata nel bioprinting. L'intera procedura è schematizzata in figura 4.5.1.

Attraverso i canali viene poi iniettata una soluzione contenente fibroblasti (FB).

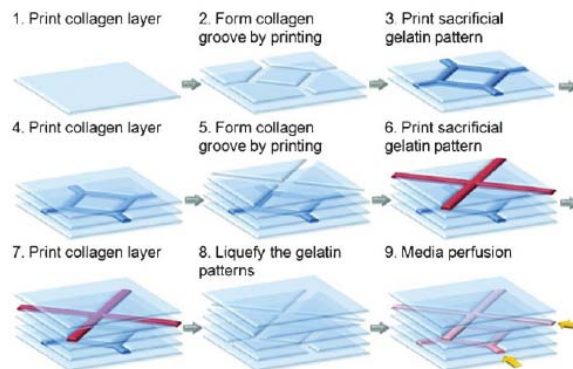


Figura 4.5.1: procedura di stampa di scaffold con micro canali.

4.5.2 Risultati [16]

Uno strato dello scaffold è formato da un canale centrale di gelatina (diametro $\sim 400 \mu\text{m}$) e da collagene attorno. Dopo una settimana dalla rimozione della gelatina viene valutata la consistenza del canale e, come mostrano i risultati, sia la sezione centrale (figura 4.5.2 f) che il bordo del canale (figura 4.5.2 g) rimangono aperti.

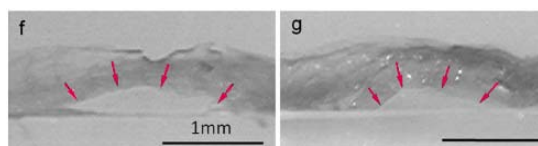


Figura 4.5.2: (f) porzione del canale centrale e (g) bordo esterno.

Dall'analisi dei dati si evince che questa tecnica è estendibile a strutture molto più complesse, con canali a vari livelli, e con particolari intreccio di trame. Dal punto di vista meccanico i canali così costruiti sono in grado di resistere a pressioni idrostatiche fino a 103.4 mmHg (pressione arteriosa media 120 mmHg). Per quanto riguarda la *cell viability* è stato condotto un confronto con uno scaffold contenente fibroblasti ma senza canali (figura 4.5.3 1). La *cell viability* nella zona superiore (a) dello scaffold, sia nel caso 1 che nel caso 2 di figura 4.5.3, è elevata e sostanzialmente insensibile alla presenza dei canali di

perfusione. Negli strati più interni (c, b), nel blocco di collagene normale cala notevolmente, rimanendo invece pressoché invariata nello scaffold con i canali. La presenza quindi di questi micro-canali aumenta la *cell viability* e la proliferazione cellulare.

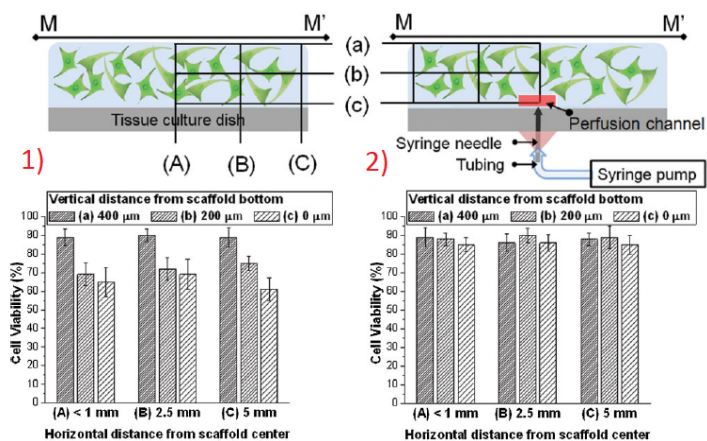


Figura 4.5.3: confronto tra la *cell viability* di scaffold con e senza canali.

5. Vasi sanguigni

I vasi sanguigni sono definiti come i condotti del sistema circolatorio che permettono di trasportare il sangue in tutti i punti del corpo. Attraverso il trasporto del sangue, i vasi riforniscono di ossigeno e sostanze nutritive l'intero organismo.

I vasi sanguigni hanno sostanzialmente tutti la stessa struttura (figura 5.0.1). La parete interna detta endotelio (tonaca interna), è formata da cellule endoteliali (HMVEC) ed è circondata da tessuto connettivo e da elastina. Più esternamente si trova uno strato di muscolo vascolare liscio (tonaca media), particolarmente sviluppato nelle arterie, che permette ai vasi di contrarsi. Come rivestimento finale vi è un ulteriore strato di tessuto connettivo noto come avventizia (tonaca esterna), contenente le terminazioni nervose impiegate per trasmettere gli impulsi provenienti dal sistema nervoso.

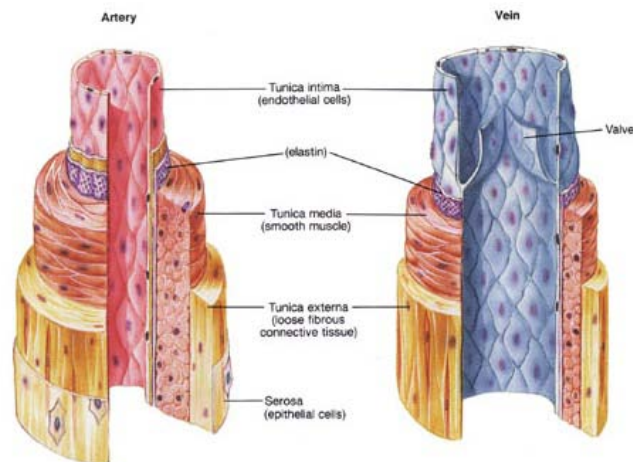


Figura 5.0.1: struttura vasi sanguigni.

La struttura dei capillari è invece più semplice: consta infatti di uno strato di endotelio e talvolta di un tessuto connettivo o lamina basale (figura 5.0.2). Le uniche cellule dei capillari sono le cellule endoteliali (HMVEC) [13].



Figura 5.0.2: struttura di un capillare.

5.1 Importanza vasi sanguigni

I successi concreti raggiunti nell'ambito del tissue engineering riguardano quasi esclusivamente la realizzazione di strutture sottili come la pelle o il tessuto della vescica [13]. Infatti non appena il tessuto ingegnerizzato supera spessori di 150-200 μm , subentra il problema di rifornire le cellule di ossigeno e nutrienti. È fondamentale quindi ricreare un sistema completo e capillare di microvasi che irrorino il neo-tessuto (e in futuro il neo-organo), così da sostenerlo nella crescita. In questo senso sono già stati fatti dei passi in avanti creando scaffold con canali per la diffusione di fattori di crescita e altre sostanze (vedi paragrafo 4.5), ma la realizzazione di veri e propri vasi sanguigni è la strada da perseguire [13]. Il canale dovrà avere le stesse caratteristiche dei vasi naturali come la capacità di ostacolare fenomeni trombotici, analoghe proprietà meccanico-fisiche e dovrà mantenere la struttura nel tempo per evitare che i microvasi si occludano provocando ischemie molto pericolose [17].

5.2 Problemi nell'uso di scaffold [14]

Nel tessuto del miocardio è necessaria un'alta densità cellulare per assicurare il sincronismo del battito. Il segnale di sincronismo passa tramite le *gap junctions* che uniscono le cellule adiacenti e quindi, più vicine sono, più il segnale passa velocemente e senza dispersioni. L'uso di uno scaffold riduce la interconnessione cellula-cellula, non permettendo quindi una pulsazione perfettamente sincrona delle cellule cardiache; inoltre comporta una deposizione inadeguata dei componenti della matrice extracellulare (ECM) e l'intrinseca debolezza degli idrogel usati per realizzare lo scaffold va ad influire

sulla resistenza finale dell'intero vaso. Poiché spesso vengono usati materiali biodegradabili, i residui che questi rilasciano durante la degradazione possono intralciare la normale formazione delle pareti dei vasi o influenzare il fenotipo delle cellule muscolari lisce (SMC) che ricoprono la parete interna.

5.3 Vasi *scaffold-free*

5.3.1 Materiali impiegati [14]

Come in altri studi, anche nell'approccio presentato dai ricercatori della Columbia University e della Yale University, coordinati dal professor Gabor Forgacs, per produrre canali da poter impiegare come vasi sanguigni si è adottata la tecnica del bioprinting. Le gocce di bioink si saldano autonomamente sfruttando il principio della morfogenesi (processo che porta allo sviluppo di una determinata struttura). Come componente cellulare sono utilizzate cellule di ovaia di criceto cinese (CHO) trattate come descritto nel paragrafo 3.4 per ottenere il bioink. Si possono ottenere sia cilindri di bioink, stampandoli su matrici di teflon o di agarosio (sostanza gelatinosa derivante dalle alghe rosse) (figura 5.3.1 B), sia sfere di bioink (figura 5.3.1 C) tagliando i cilindri in parti eguali e mettendole in un contenitore giroscopico per una notte.

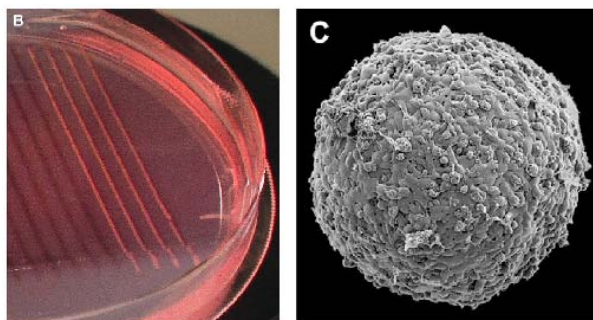


Figura 5.3.1: (B) cilindri di bioink, (C) sfere di bioink.

Ogni sfera contiene da 8000 a 15000 cellule. I bastoncini di agarosio vengono utilizzati come blocchetti per costruire la sagoma della struttura voluta: fungono quindi da biopaper.

5.3.2 Risultati [14]

Il primo approccio prevede la deposizione alternata, secondo una sequenza ben precisa, dei bastoncini di agarosio e delle sfere multicellulari fino ad ottenere la struttura desiderata (figura 5.3.2).

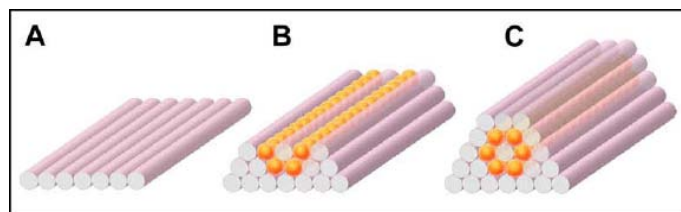


Figura 5.3.2: processo di formazione del vaso tramite sfere di bioink.

Tramite questo metodo, il tubo più piccolo che si può realizzare ha il diametro di 900 μm e lo spessore delle pareti è di 300 μm . Una volta deposte (figura 5.3.3 A) le sfere di bioink si fondono tra loro in un periodo di tempo che va da 5 a 7 giorni (figura 5.3.3 B). Come si può vedere dalla figura 5.3.3, si possono realizzare strutture complesse, con bracci di diametri differenti che si diramano dal vaso principale, riproponendo quella che è la reale conformazione dei vasi sanguigni.

L'impiego di sfere di bioink comporta però alcune problematiche:

- la realizzazione di una quantità sufficiente di bioink per produrre un vaso abbastanza lungo e ampio richiede molto tempo;
- la fusione delle sfere richiede anche una settimana e non sempre porta a una superficie regolare del vaso;
- assemblare manualmente un vaso in un ambiente perfettamente sterile richiede numerosi accorgimenti.

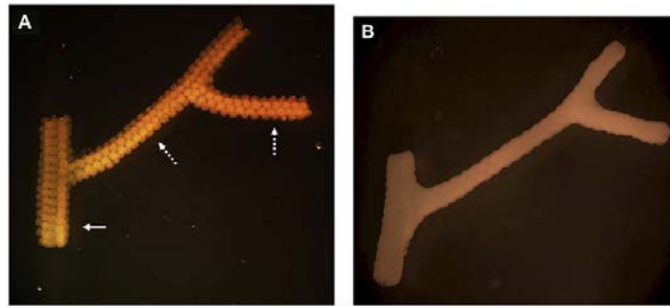


Figura 5.3.3: (A) sfere appena deposte, (B) sfere fuse dopo 5-7 giorni

Per questi motivi alle sfere sono preferiti i cilindri di bioink (lungi fino a 7 cm) deposti in modo analogo a quanto descritto sopra (figura 5.3.4 A,B). Uno dei vantaggi di usare i cilindri è la possibilità di rendere automatico il processo di deposizione tramite l'impiego di opportuni software che comandano la stampante. Quest'ultima ha in una cartuccia il bioink e nell'altra l'agarosio, così da poter deporre simultaneamente i due materiali. I cilindri si fondono dopo soli 2-4 giorni dalla deposizione: rimuovendo il supporto di agarosio si ottiene il vaso finale (figura 5.3.4 C).

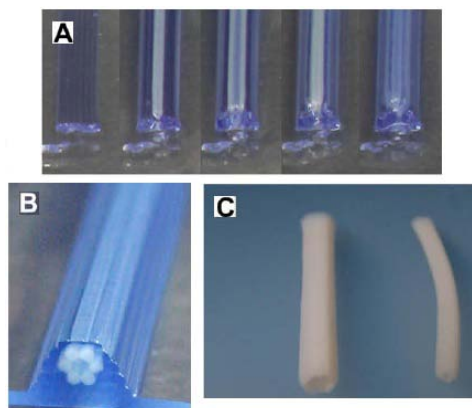


Figura 5.3.4: processo di formazione del vaso tramite cilindri di bioink.

Come ulteriore test, viene costruito un vaso formato da due strati diversi di cellule: sono usati sia cilindri di cellule della muscolatura liscia dell'utero (HUSMCs) che di fibroblasti della pelle (HSFs). Si è notato come più la struttura è complessa ed eterogenea, più il tempo affinché le cellule si fondano è lungo.

Nelle prove effettuate sono stati prodotti vasi a uno o due strati con diametri che variano da 0.9 a 2.5 mm. Un grande vantaggio di questo approccio è la possibilità di avere una densità cellulare molto elevata. Dopo che le sfere o i cilindri si sono fusi, il prodotto viene trasferito in un bioreattore per una maturazione ulteriore, così da acquisire sufficienti caratteristiche meccaniche per poter essere impiantato.

5.4 Microvasi realizzati con HMVEC e fibrina

5.4.1 Materiali impiegati [13]

Nell'articolo pubblicato da T. Boland e X. Cui si propone di usare come componenti per il bioink le cellule endoteliali dei microvasi (HMVECs) e come biopaper uno scaffold di fibrina. Sono impiegate queste cellule perché sono le uniche a comporre i capillari e costituiscono la parete interna di tutti i vasi dell'organismo. Inoltre hanno la capacità di regolare il loro numero in base alle esigenze dell'ambiente in cui si trovano. La fibrina gioca un ruolo importante nel naturale processo di guarigione: viene infatti prodotta dal sangue dei pazienti stessi come fosse uno scaffold autologo. La fibrina è ottenuta dalla polimerizzazione di fibrinogeno e trombina a temperatura ambiente per 6 minuti. Le proporzioni ottimali per ottenere uno scaffold continuo e senza deformazioni (figura 5.4.1) sono: 60 mg/ml di fibrinogeno, 50 unità/ml di trombina, 80 mM di CaCl_2 . Sia le cellule che la fibrina sono trattate come descritto nel paragrafo 3.4 e 3.5 per ottenere rispettivamente il bioink e la biopaper.

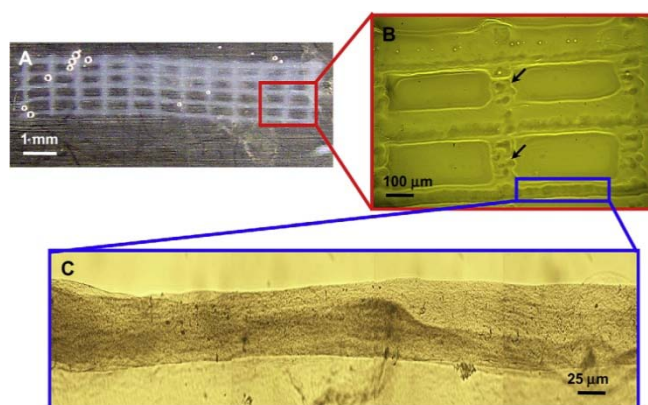


Figura 5.4.1: struttura dello scaffold di fibrina.

5.4.2 Risultati [13]

Lo scaffold di fibrina sottoposto ai test meccanici mostra un ottimo comportamento, presentando un modulo elastico di 2.9 MPa e sopportando una pressione fino a 2955 mmHg. Inoltre all'analisi con il SEM si può vedere come all'interno della fibra ci sia un canale vuoto adatto all'impianto e alla proliferazione delle cellule (figura 5.4.2).

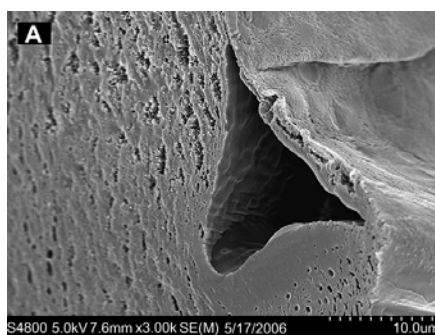


Figura 5.4.2: sezione di fibra di fibrina che evidenzia il canale interno.

Nello scaffold di fibrina vengono poi deposte le cellule (HMVECs). Già dopo 24 ore le cellule cominciano a proliferare e, dopo 21 giorni di coltura, si allineano e si organizzano per formare il rivestimento cellulare del canale. Durante la proliferazione infatti le cellule tendono a formare una struttura tubolare come conseguenza del processo di angiogenesi. Dai risultati dei test effettuati si evince che dopo 21 giorni l'integrità del microvaso è mantenuta. Si conclude

quindi che la simultanea deposizione di fibrina e HMVECs tramite il bioprinting, permette di ottenere microvasi adatti per un futuro impiego clinico.

6. Conclusioni

6.1 Stato attuale

Il bioprinting in questi ultimi anni sta avendo una crescita esponenziale. È importante dare visibilità a questa tecnica così che altre equipe di ricercatori e soprattutto le aziende vi dedichino il loro lavoro. In questo senso vengono viste come interessanti e cruciali le conferenze internazionali di fine 2010 (3B'10) a Philadelphia e del 2011 in Giappone [5].

I risultati ad oggi raggiunti non sono ancora sufficienti per consentire ai tessuti prodotti di trovare un largo impiego in campo medico. Rimangono molte limitazioni tecniche che impediscono una produzione di tessuti quantitativamente significativa dal punto di vista clinico, ma sicuramente la strada intrapresa verso la realizzazione di tessuti utilizzando solo materiale biologico e senza l'impiego di scaffold rigidi, è promettente. Concretamente si sono finora realizzati microvasi sanguigni (Capitolo 5), fondamentali per la futura realizzazione di strutture più complesse, alcune terminazioni nervose e porzioni di vescica. La produzione di tessuto ingegnerizzato, oltre all'impiego nella riparazione/sostituzione, può essere utile nell'ambito della ricerca clinica: infatti può servire come materiale di test per nuovi farmaci e terapie volte a curare malattie non ancora del tutto curabili, fornendo risultati molto più attendibili di quelli ottenuti usando materiali sintetici meno simili al tessuto naturale.

6.1.1 Tessuto nervoso [19]

Il tessuto nervoso è uno dei tessuti fondamentali che compongono l'organismo. La sua funzione principale è quella di ricevere e trasmettere le informazioni e gli stimoli provenienti dall'esterno e dal sistema nervoso centrale. È formato

principalmente da due tipi di cellule: i neuroni, i veri responsabili della trasmissione dei segnali e le cellule gliali o della nevroglia che hanno la funzione di supporto strutturale e funzionale ai neuroni. Tra le cellule gliali ci sono gli astrociti, gli ependimociti, i microglia e le cellule di Schwann. La collaborazione tra le università di Harvard e il KAIST di Daejeon, ha prodotto una ricerca sullo sviluppo di tessuto nervoso attraverso il bioprinting. L'approccio è simile a quello visto nei Capitoli 4 e 5 poiché viene impiegato uno scaffold di collagene, usato come biopaper, depresso tramite una bioprinter a 4 cartucce. Come componente cellulare del bioink sono utilizzati astrociti e neuroni prelevati da embrioni di topo. Questi ultimi vengono poi sospesi in un liquido di coltura e diluiti alla concentrazione di 3×10^6 cellule/ml: concentrazioni maggiori porterebbero all'ostruzione degli ugelli della cartuccia di stampa. In ogni goccia sono presenti 217.8 neuroni e 49.8 astrociti. La stampa procede per strati, alternando uno strato di idrogel di collagene a uno dove viene depresso il bioink. Viene valutata la *viability* delle cellule stampate e dai risultati si vede come tenda addirittura a migliorare rispetto a quella delle cellule di controllo (78.6 contro 75.2 dei neuroni di controllo). Dopo 12 giorni di coltura si possono cominciare a vedere gli astrociti e i neuroni che si organizzano in strutture compatte, analoghe a un semplice tessuto neuronale (figura 6.1.1). Questo risultato è un promettente segnale per futuri sviluppi nel campo dei neuro tessuti.

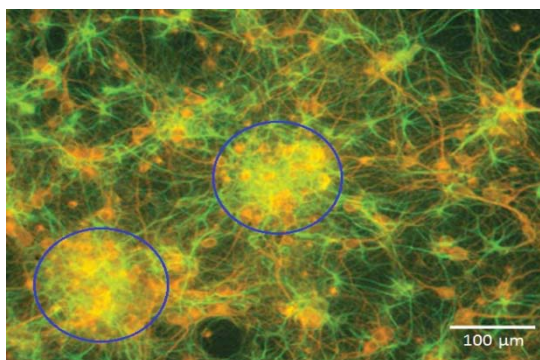


Figura 6.1.1: astrociti in verde, neuroni in arancione. Nei cerchi blu i raggruppamenti di astrociti e neuroni.

6.1.2 Tessuto epatico [20]

Nell'Istituto di scienze industriali dell'Università di Tokyo, un gruppo di ricercatori ha cercato di riprodurre una quantità clinicamente significativa di tessuto epatico (500 cm³ ossia il 30 % dell'intera massa del fegato). Questo tessuto deve servire per sostituire parti malate di fegato e quindi deve avere una funzionalità comparabile con quella del tessuto naturale. Grande interesse ruota attorno al fegato poiché è il centro di vari processi metabolici dell'organismo e l'unica cura attualmente efficace è il trapianto da donatore con tutti i problemi e rischi che esso comporta. La grande versatilità del fegato è dovuta alle sue cellule, gli epatociti, e alla complicata struttura dell'organo (figura 6.1.2).

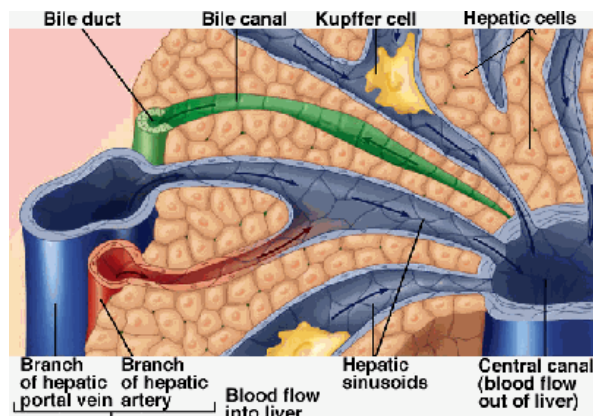


Figura 6.1.2: struttura fegato.

Dalle analisi fatte si è visto come la riproduzione *in vitro* degli epatociti sia molto più difficile di quella che avviene naturalmente in vivo, comportando un ulteriore ostacolo al raggiungimento dell'obiettivo finale. Un'altra caratteristica degli epatociti che complica il progetto è il consumo di ossigeno che nelle cellule del fegato è 10 volte superiore rispetto ad altre cellule. Diventa ancor di più necessaria una fitta rete di capillari che irrori il tessuto per supportare la richiesta di ossigeno. Poiché molto è il lavoro da fare e alti sono i rischi, i

ricercatori hanno proposto una *road map* che prevede un'iniziale ricerca sui maiali per poi passare alla sperimentazione sull'uomo (figura 6.1.3).

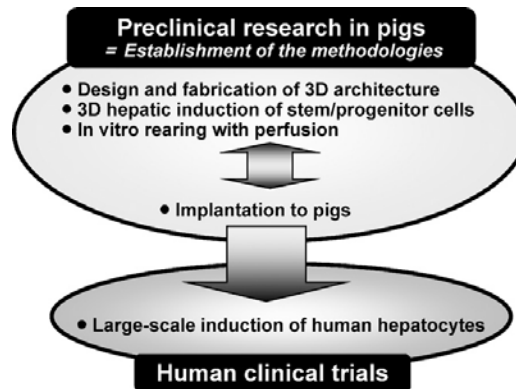


Figura 6.1.3: *road map* dello sviluppo di tessuto epatico.

Tra le varie tecniche testate vi è anche il bioprinting. In questo caso il bioink è costituito prevalentemente da epatociti depositati strato su strato su un idrogel fotopolimerizzabile (RGD-peptide polietilene glicolico). Si costruisce una struttura composta da cellule e tubi di idrogel del diametro di 500 μm . Lo spazio restante è utilizzato per diffondere il liquido di coltura e l'ossigeno. Grazie alla possibilità di automatizzare il processo, in un futuro prossimo sarà possibile produrre una quantità sufficiente di tessuto epatico per applicazioni mediche.

6.2 Previsioni future

Grandi aspettative ci sono attorno al bioprinting, ma per poter apprezzare risultati concreti si dovranno aspettare ancora alcuni anni. Gabor Forgacs, professore e ricercatore della Missouri University nonché co-fondatore di Organovo, in un'intervista rilasciata a una radio americana (npr) il 14 Marzo scorso prevede che i primi test clinici su umani non avverranno prima di cinque anni. Le sperimentazioni sugli animali sono però già cominciate e il suo team è riuscito ad impiantare delle terminazioni nervose su cavie di laboratorio. Per

poter vedere invece interi organi prodotti tramite il bioprinting, se questo mai avverrà, bisognerà aspettare almeno altri vent'anni, secondo quanto dicono i maggiori esponenti del campo.

6.2.1 Organ printing [8]

Come detto l'obiettivo finale e più ambizioso che il bioprinting si prefigge è di riuscire a produrre un intero organo funzionante da poter sostituire nei pazienti che ne necessitano in alternativa al trapianto. Anche se al momento non è ancora possibile, in un articolo, pubblicato tra gli altri da G. Forgacs e V. Mironov, si abbozza il percorso che si dovrà intraprendere per raggiungere questo obiettivo. Si analizzano tutti i pro, i contro e le caratteristiche che il bioprinting possiede, per capire cosa bisogna migliorare. Uno degli aspetti che vengono sottolineati è la riproducibilità e l'automatismo di questa tecnica, proprietà fondamentali perché in futuro si possa pensare a una "catena di montaggio" di organi. Viene riconfermato che un approccio *scaffold-free* è assolutamente preferibile a qualunque altro tipo di approccio. Nell'articolo viene proposta una traccia per la fabbricazione di organi (figura 6.2.1).

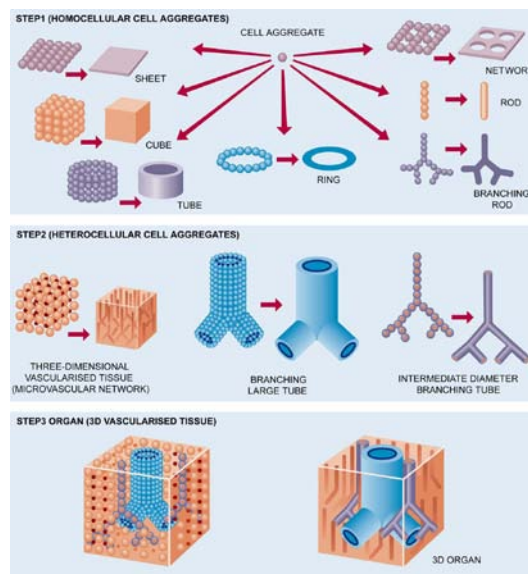


Figura 6.2.1: road map per la produzione di organi.

6.3 Ricercatori e aziende

6.3.1 Persone

Qui di seguito sono presentati i ricercatori e i professori che maggiormente hanno contribuito allo sviluppo del bioprinting, anche se molti altri hanno dato contributi comunque significativi:

- Atala Anthony: professore e direttore della Wake Forest Institute for Regenerative Medicine alla University School of Medicine in North Carolina. Dal 2004 si occupa di tissue engineering e di bioprinting, riuscendo insieme al suo gruppo di lavoro nel 2006 a sostituire una porzione di vescica danneggiata con una ingegnerizzata realizzata con cellule autologhe;
- Boland Thomas: professore e direttore del Biomedical Engineering Program della University of Texas a El Paso. È stato uno dei pionieri del bioprinting, insieme a V. Mironov [5]. Le sue ricerche sono incentrate sullo sviluppo di un sistema di *cell-printing* per realizzare strutture bi-tridimensionali per applicazioni nel tissue engineering;
- Forgacs Gabor: professore di biofisica alla University of Missouri e co-fondatore dell'azienda Organovo. Ha indagato sui meccanismi fisici dello sviluppo degli embrioni e li ha applicati per realizzare strutture viventi, funzionali e con una forma ben precisa attraverso il bioprinting. È riuscito così a stampare il primo vaso sanguigno e con successo ha impiantato una terminazione nervosa su una cavia. È stato inserito tra le 100 persone più creative del 2010 dalla rivista americana Fast Company;
- Mironov Vladimir: professore associato e direttore del Advanced Tissue Biofabrication Center del dipartimento di medicina rigenerativa e biologia cellulare alla Medical University of South Carolina (MUSC). Il suo campo di ricerca comprende la biologia vascolare e il tissue engineering ed è stato inoltre uno dei pionieri del bioprinting [5]. Autore di molti libri e articoli a riguardo, pubblica su riviste internazionali come "Biofabrication", "Journal of Angiogenesis Research" e "Expert Opinion on Biological Therapy";

- Nakamura Makoto: professore alla Osaka University in Giappone, è stato uno dei primi, nel 2003, a riconoscere il potenziale della tecnologia inkjet per stampare cellule umane. È riuscito finora a produrre tubicini di tessuto simili a vasi sanguigni. Lavora in stretta collaborazione con l'azienda multinazionale Epson;
- Vozzi Giovanni: professore all'Università di Pisa e membro del Tissue Engineering and Microfabrication Team. Gli obiettivi di questo gruppo di ricerca sono sostanzialmente due: la messa a punto di un bioreattore che permetta una veloce e precisa maturazione dei tessuti e la *microfabrication*. Proprio all'ultimo convegno internazionale (3B'09) ha presentato un innovativo scaffold che permette il passaggio di segnali elettrici [5].

6.3.2 Aziende

Oltre al lavoro svolto dai ricercatori nelle università di tutto il mondo, è fondamentale per lo sviluppo del bioprinting l'interessamento da parte di aziende. Infatti come in tutti i campi di ricerca, per portare avanti un progetto vi è bisogno di cospicui finanziamenti e spesso quelli pubblici non sono sufficienti. È necessario quindi l'intervento di soggetti privati che finanzino la ricerca, vedendo nel risultato finale una possibilità di guadagno. Questo è allo stesso tempo un limite, poiché l'attività di ricerca svolta non può essere fine a se stessa ma viene condizionata da logiche commerciali. D'altro canto senza l'intervento di aziende private non si potrebbero ottenere i risultati cercati, la produzione e la diffusione su larga scala. Al bioprinting si sono interessate già alcune aziende, soprattutto per la realizzazione di stampanti pensate esclusivamente per questa tecnica. Una compagnia di San Diego, Organovo, in collaborazione con l'azienda di automazione australiana Invetech, lancerà sul mercato nel 2011 la prima bioprinter. Il costo previsto è ancora molto elevato, 200000 \$, ma si spera che, con la produzione e la commercializzazione di altre biostampanti, il prezzo possa diminuire e le prestazioni migliorare. In

competizione con Organovo c'è l'azienda americana Tengion che si occupa di biotecnologie in ambito clinico. Questa compagnia possiede i brevetti del professor Atala che hanno permesso di produrre già alcuni tessuti da impiantare su pazienti, come sezioni di vescica o di intestino e vasi sanguigni. Altre compagnie già affermate nella produzione delle tradizionali stampanti inkjet si stanno interessando a questo campo, come la Epson con cui collabora il professor Nakamura, e la Xerox che sta eseguendo delle ricerche nel Palo Alto Research Centre (PARC).

BIBLIOGRAFIA

- [1] “Biomateriali – introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico”; *Carlo Di Bello*; Pàtron editore, prima edizione (2004)
- [2] “Matrici polimeriche biodegradabili porose ottenute attraverso sinterizzazione di micro particelle”; *Alessia Luciani*; Tesi di Dottorato di ricerca in ingegneria dei materiali e delle strutture, Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Napoli Federico II
- [3] “Tissue spheroid fusion-based in vitro screening assays for analysis of tissue maturation”; *Zoltan Hajdu, Vladimir Mironov, Agnes Nagy Mehesz, Russell A. Norris, Roger R. Markwald, Richard P. Visconti*; *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine* July (2010)
- [4] “Microengineered hydrogels for tissue engineering”; *Ali Khademhosseini, Robert Langer*; *Biomaterials* Vol. 28 (2007) 5087 – 5092
- [5] “Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)”; *Fabien Guillemot, Vladimir Mironov, Makoto Nakamura*; *Biofabrication* Vol. 2 (2010) Editorial
- [6] “Synthesis and characterization of biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds fabricated by the inkjet technique”; *Changhong Zhang, Xuejun Wen, Naren R. Vyavahare, Thomas Boland*; *Biomaterials* Vol. 29 (2008) 3781 – 3791
- [7] “Adventure in bioprinting: how to print a kidney”; *Vladimir Mironov, T.Fedak*; Medical University of South Carolina
- [8] “Organ printing: Tissue spheroids as building blocks”; *Vladimir Mironov, Richard P. Visconti, Vladimir Kasyanov, Gabor Forgacs, Christopher J. Drake, Roger R. Markwald*; *Biomaterials* Vol. 30 (2009) 2164 – 2174
- [9] “EDTA enhances high-throughput two-dimensional bioprinting by inhibiting salt scaling and cell aggregation at the nozzle surface”; *Cheryl A. Parzel,*

- Matthew E. Pepper, Timothy Burg, Richard E. Groff, Karen J.L. Burg*; Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine Vol. 3 (2009) 260 – 268
- [10] “Making a bit of me - Printing body parts”; *The Economist* 20.02.2010, 77 – 78
- [11] “Design and Implementation of a Two-Dimensional Inkjet Bioprinter”; *Matthew E. Pepper, Cheryl A. Parzel, Timothy Burg, Thomas Boland, Karen JL Burg, Richard E. Groff*; Conference proceedings Engineering in Medicine and Biology Society (2009) 6001 – 6005
- [12] “Cell Damage Evaluation of Thermal Inkjet Printed Chinese Hamster Ovary Cells”; *Xiaofeng Cui, Delphine Dean, Zaverio M. Ruggeri, Thomas Boland*; Biotechnology and Bioengineering Vol. 106 (2010) 963 – 969
- [13] “Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology”; *Xiaofeng Cui, Thomas Boland*; Biomaterials Vol. 30 (2009) 6221 – 6227
- [14] “Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting”; *Cyrille Norotte, Francois S. Marga, Laura E. Niklason, Gabor Forgacs*; Biomaterials Vol. 30 (2009) 5910 – 5917
- [15] “Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture”; *Yeong-Bae Lee, Samuel Polio, Wonhye Lee, Guohao Dai, Lata Menon, Rona S. Carroll, Seung-Schik Yoo*; Experimental Neurology Vol. 223 (2010) 645 – 652
- [16] “On-Demand Three-Dimensional Freeform Fabrication of Multi-Layered Hydrogel Scaffold With Fluidic Channels”; *Wonhye Lee, Vivian Lee, Samuel Polio, Phillip Keegan, Jong-Hwan Lee, Krisztina Fischer, Je-Kyun Park, Seung-Schik Yoo*; Biotechnology and Bioengineering Vol. 105 (2010) 1178 – 1186
- [17] “Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication”; *Vladimir Mironov, Vladimir Kasyanov, Roger R. Markwald*; Trends in Biotechnology Vol. 26 (2008) 338 – 344
- [18] “Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates”; *Aleksander Skardal, Jianxing Zhang, Glenn D. Prestwich*; Biomaterials Vol. 31 (2010) 6173 - 6181

- [19] “Three-dimensional bioprinting of rat embryonic neural cells; Wonhye Lee, Jason Pinckney, Vivian Lee, Jong-Hwan Leea, Krisztina Fischer, Samuel Polio, Je-Kyun Park and Seung-Schik Yoo; *Neuroreport* Vol. 20 (2009) 798 – 803
- [20] “Toward engineering of vascularized three-dimensional liver tissue equivalents possessing a clinically significant mass”; *Yasuyuki Sakai, Hongyun Huang, Sanshiro Hanada, Toshiki Niino*; *Biochemical Engineering Journal* Vol. 48 (2010) 348 - 361