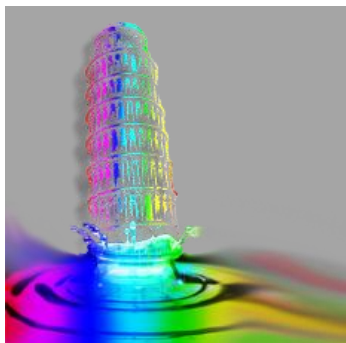




Centro E. Piaggio
bioengineering and robotics research center

Stampa 3D e biofabbricazione in ambito biomedicale



Irene Chiesa
Università di Pisa
Centro di ricerca “Enrico Piaggio”

irene.chiesa@phd.unipi.it

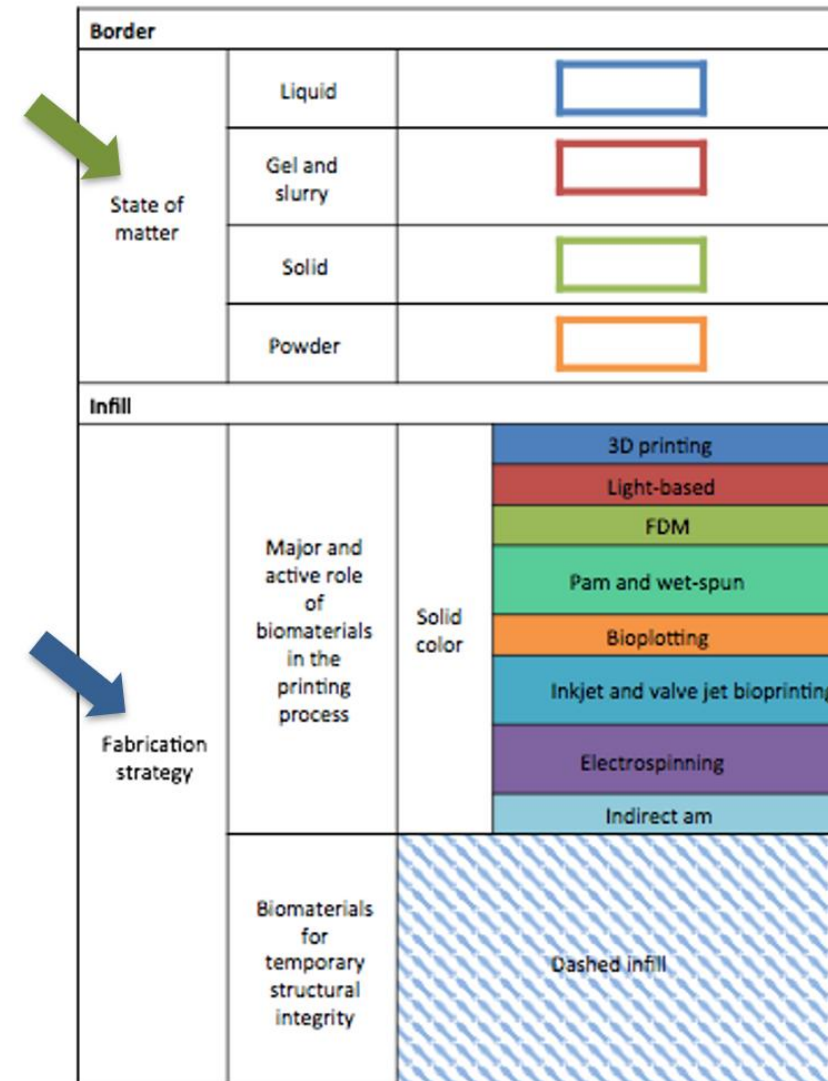
+ Outline



- Introduzione alla stampa 3D
- Pipeline di stampa: Definizione del modello 3D
- Modelli 3D da immagini biomedicali
- Introduzione al CAD
- Descrizione delle varie tecniche di fabbricazione
- Stampa 4D
- Slicing con cura
- Introduzione **all'ingegneria dei tessuti**
- Definizione di **biofabbricazione, bioassembly e bioprinting**
- Focus sulla **stampa 3D ad estrusione**
- Stampa di **materiale vivente**
- **Nuovi trend** nel bioprinting
- Introduzione ai **bioreattori**
- **Clinical translation** dei costrutti biostampati
- Esempi significativi in letteratura

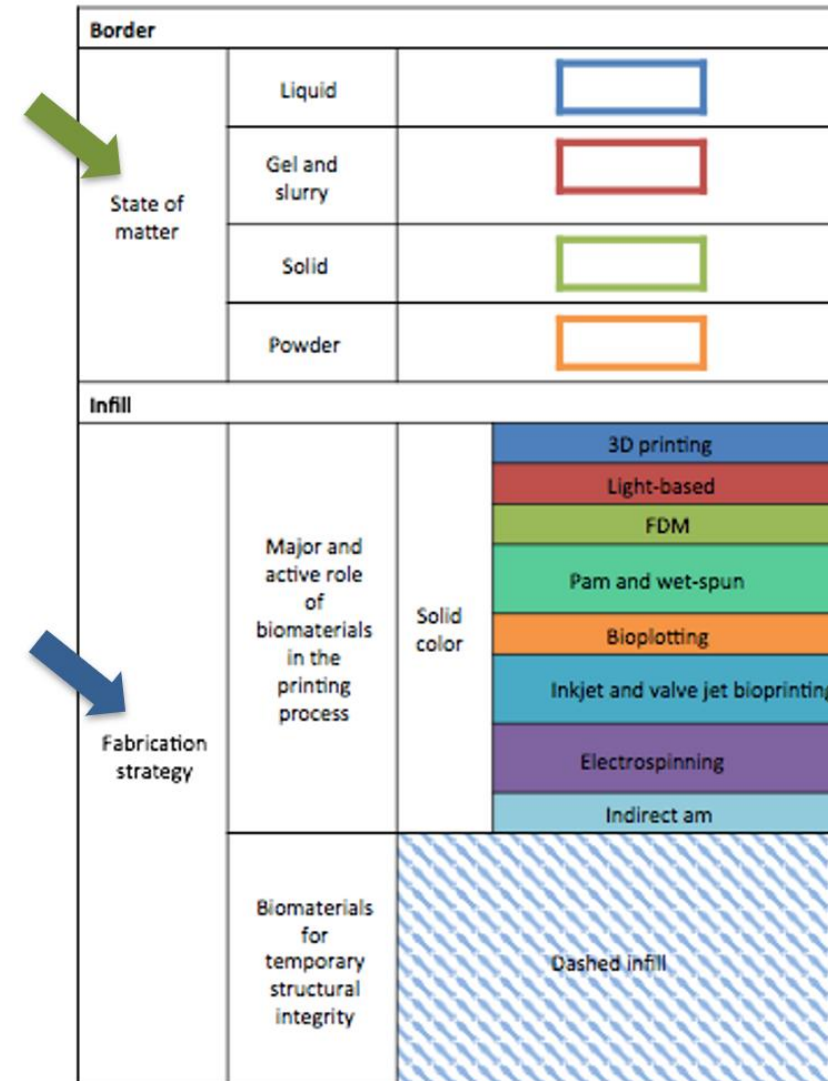
+ Tecnologie di stampa 3D

- Fused deposition modelling
- Tecnologie light-based
 - Stereolitografia
 - Fotopolimerizzazione a due fotoni
 - Liquid Induced Transfer Forward
 - Laser sintering
- Tecnologie inkjet
 - Inkjet 2D
 - Tecnologia Polyket
 - Tecnologia Binder Jetting (3D printing™)
- Stampa 3D ad estrusione
- Electrospinning
- Melt electrospinning
- Stampa 3D indiretta



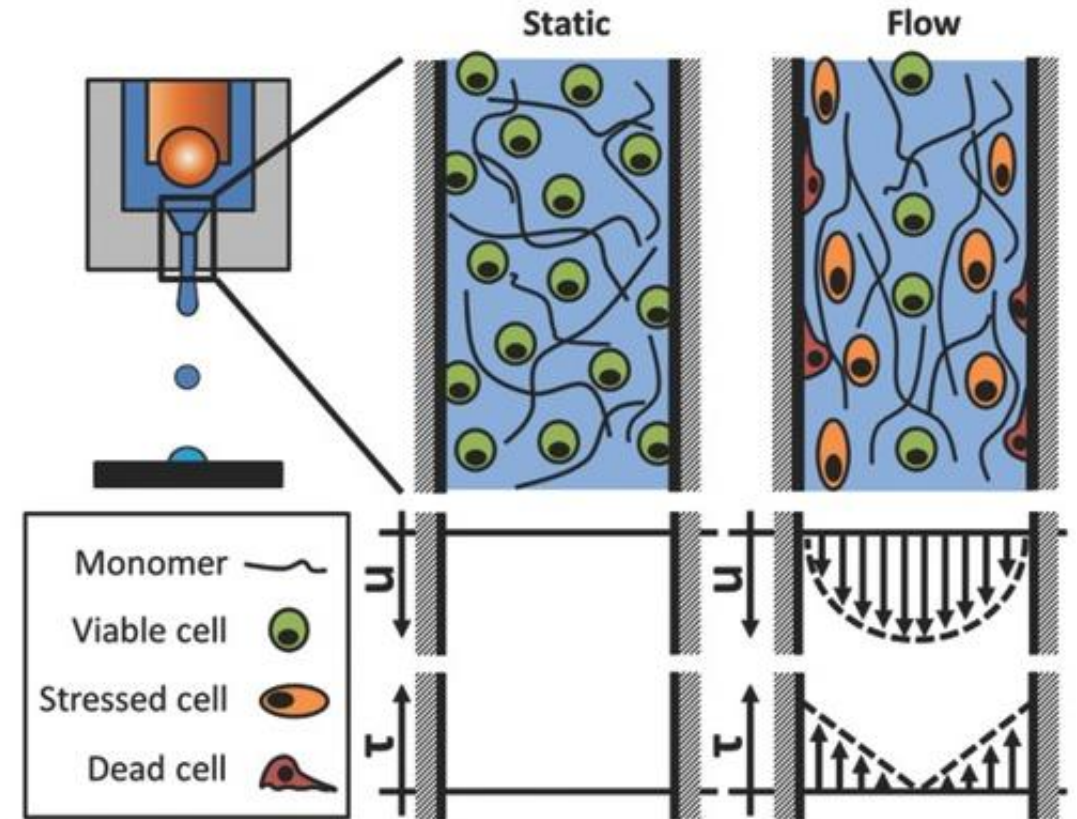
+ Tecnologie di stampa 3D

- Fused deposition modelling
- Tecnologie light-based
 - **Stereolitografia**
 - Fotopolimerizzazione a due fotoni
 - **Liquid Induced Transfer Forward**
 - Laser sintering
- Tecnologie inkjet
 - **Inkjet 2D**
 - Tecnologia Polyket
 - Tecnologia Binder Jetting (3D printing™)
- **Stampa 3D ad estrusione**
- Electrospinning
- Melt electrospinning
- **Stampa 3D indiretta**



+ Stampa di materiale biologico

- Durante la stampa le cellule sono soggette a **sforzi di taglio** che emergono all'interno del materiale .
- Se gli **sforzi di taglio** superano una **certa soglia** oppure se un dato sforzo è applicato per un **tempo troppo lungo** le cellule possono essere **danneggiate**



- Li, M., Tian, et al. (2010). Modeling process-induced cell damage in the biodeposition process. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 16(3), 533.
- Emmermacher, J. et al. (2020). Engineering considerations on extrusion-based bioprinting: interactions of material behavior, mechanical forces and cells in the printing needle. *Biofabrication*, 12(2), 025022.

+ Stampa di materiale biologico



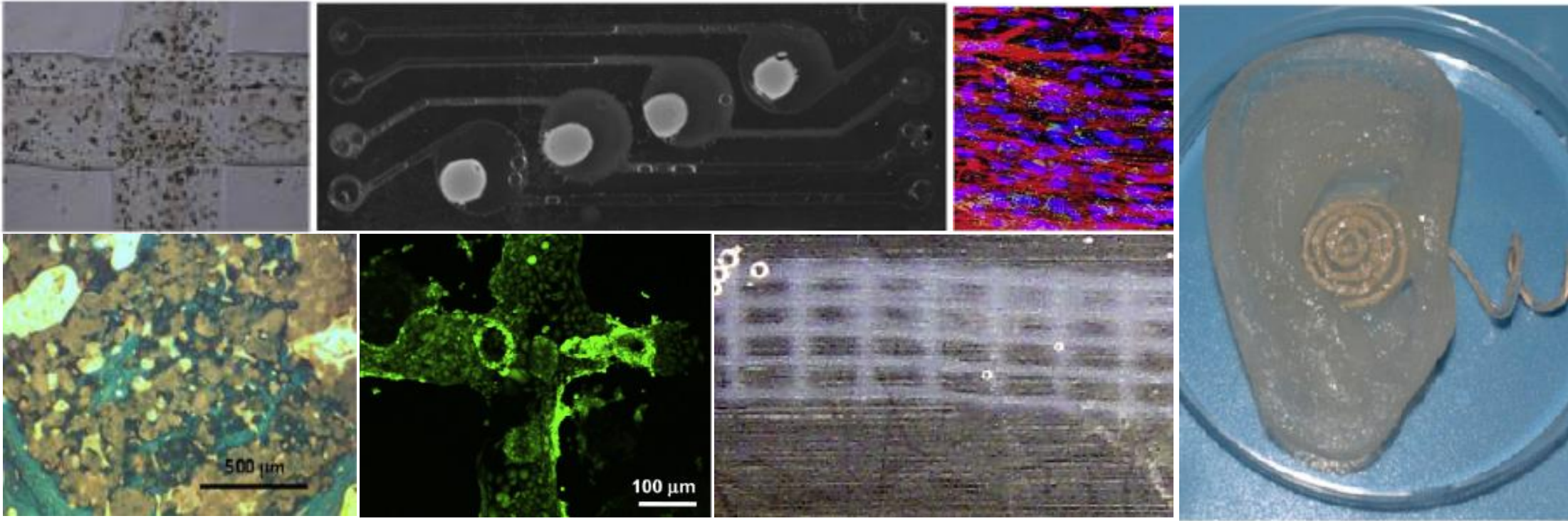
La stampa ad estrusione può lavorare a **temperature ambiente o a 37°C** e non utilizza **solventi tossici**. Di conseguenza se viene scelto **un appropriato biomateriale**, le **cellule** possono essere risospese all'interno del biomateriale prima della stampa e **possono essere depositate insieme al materiale**

PROS

- Precisa e predefinita deposizione delle cellule nello scaffold
- Creazione di gradienti di cellule nello scaffold

CONS

- È richiesta la sterilità
- Le cellule possono subire danni nell'estrusione



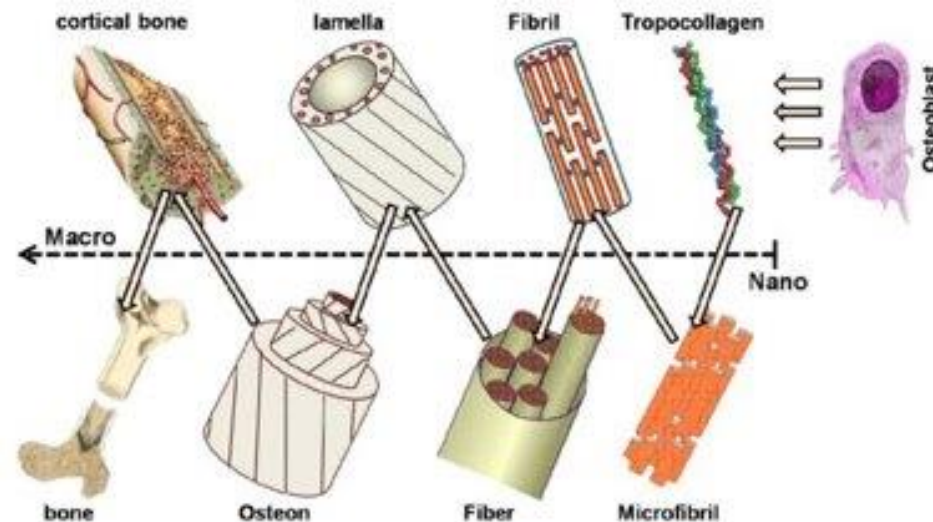
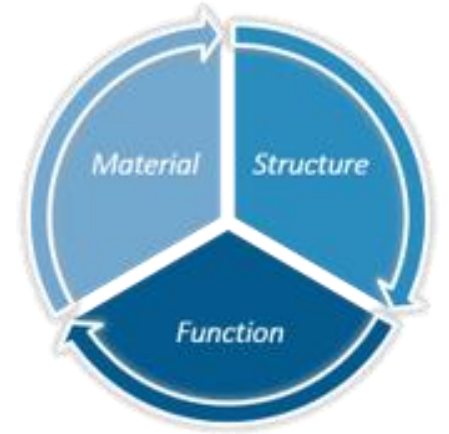
Nuovi trend nel bioprinting

- 3D bioprinting multiscale
 - In situ bioprinting

+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriale

L'aggiunta di **fattori multiscala** favoriscono la fabbricazione di **costrutti biomimetici**

- La **macroscale** è necessario per le **applicazioni clinici**
- La **nanotopologia** gioca un ruolo fondamentale nell'**adesione cellulare**.
- I **tessuti umani** sono **eterogenei**

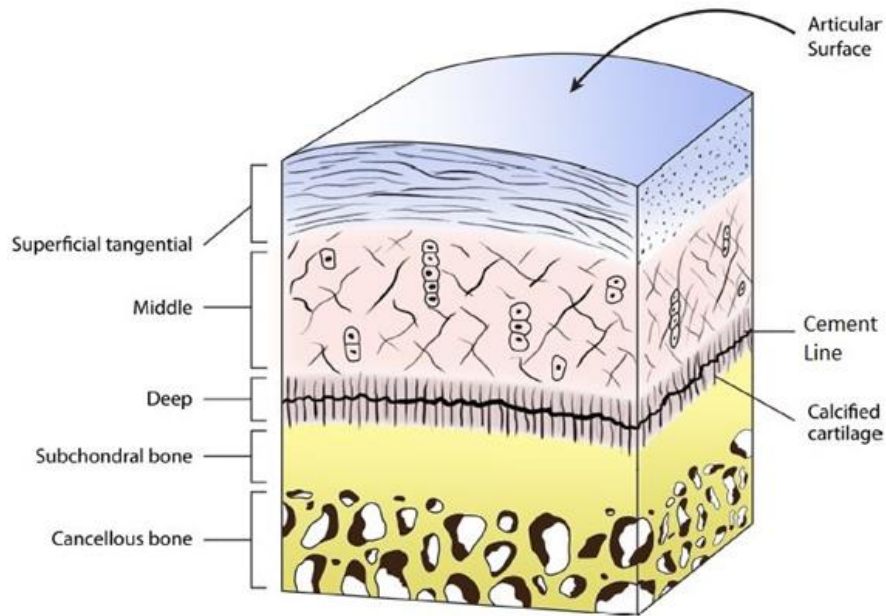


+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriale

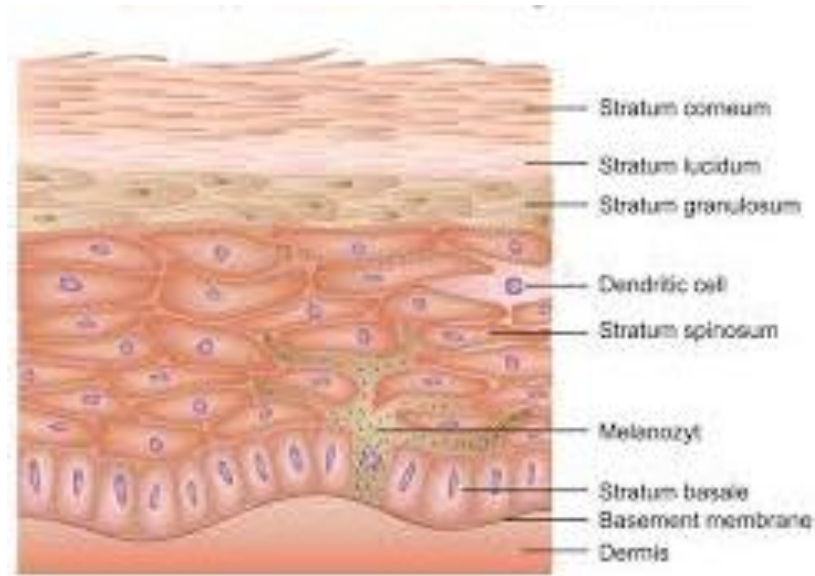


Fabbricazione di scaffold funzionalmente graduate.

Scaffold funzionalmente graduate: strutture in grado di mimare più correttamente i tessuti umani che presentano variazioni spaziali di proprietà **meccaniche, fisiche e biochimiche**



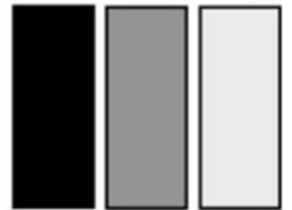
Giunzione osteocondrale



Epidermide



Biphasic FGS



Triphasic FGS



Multiphasic FGS



Continuous FGS

+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriale



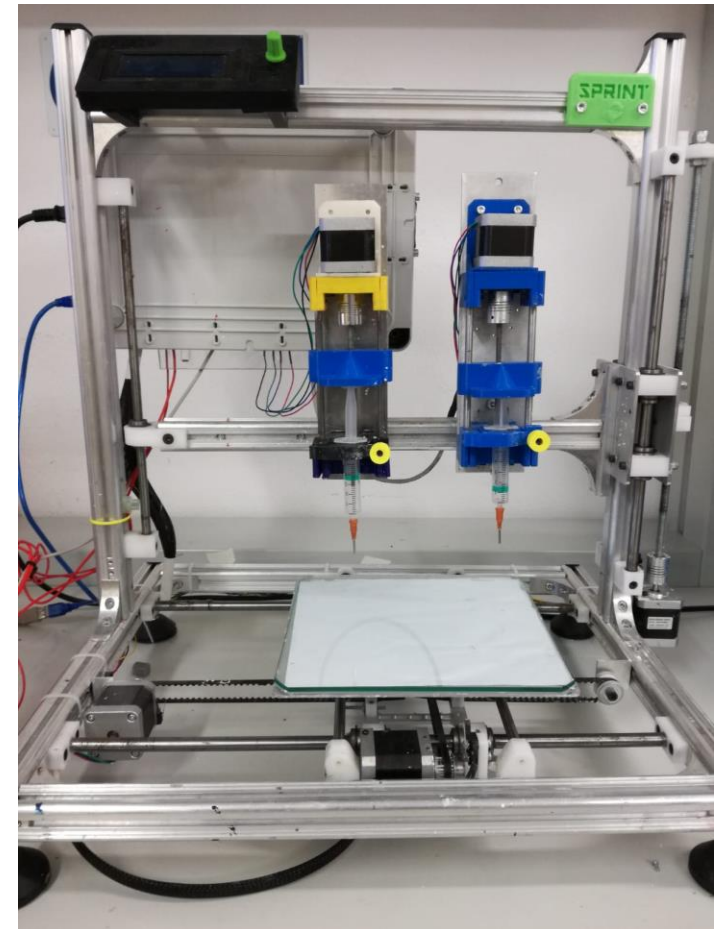
Nelle **stampanti 3D ad estrusione**, spesso è possibile avere **due o più estrusori**.

Vantaggi:

- Utilizzo di un materiale come supporto
- Fabbricazione di strutture graduate
-

Svantaggi:

- Calibrazione
- Maggior costo
-



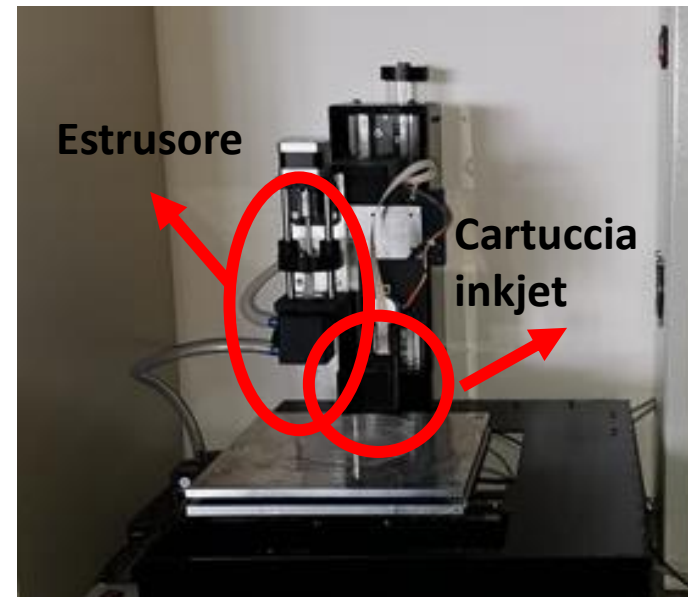
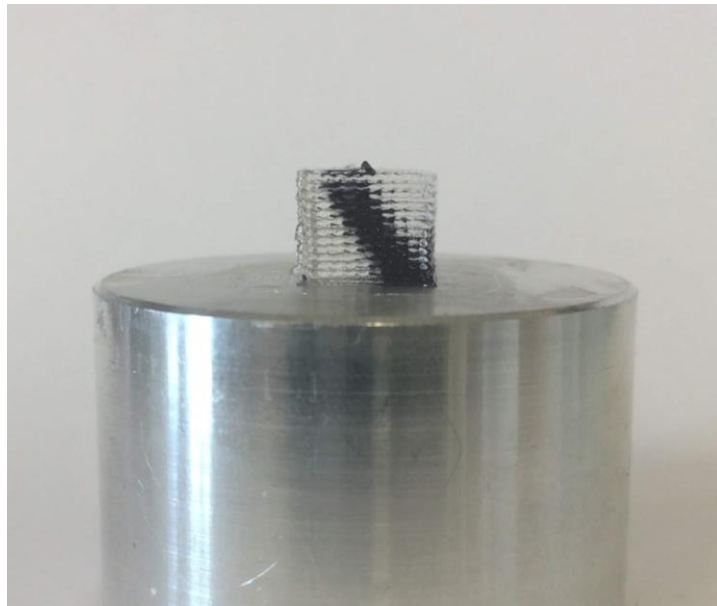
+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriale



Tecnologie ibride

Combinare differenti tecnologie di additive manufacturing per fabbricare scaffold multiscala

- Stampa 3D as estrusione + Stampa inkjet
- Stampa 3D as estrusione + electrospinning
- Stampa Inkjet + electrospinning



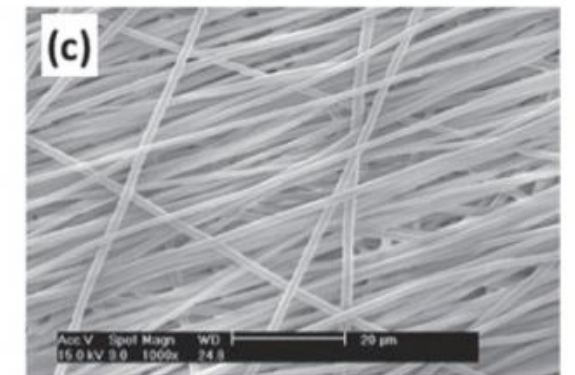
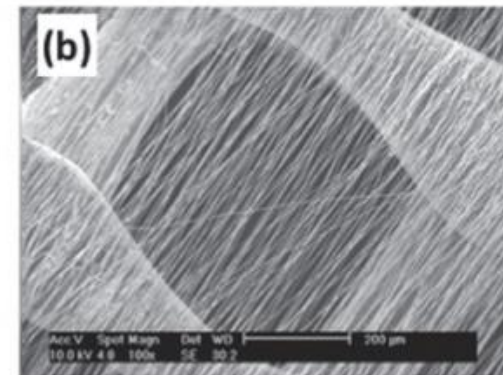
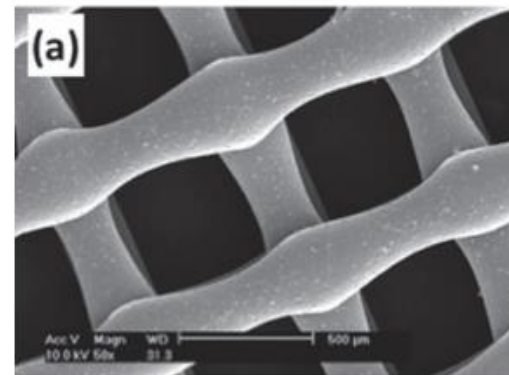
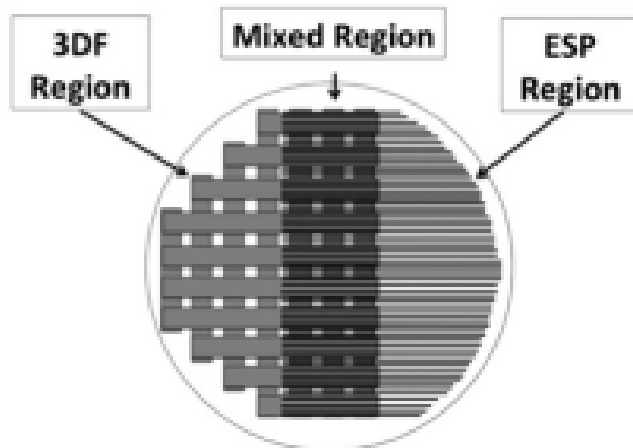
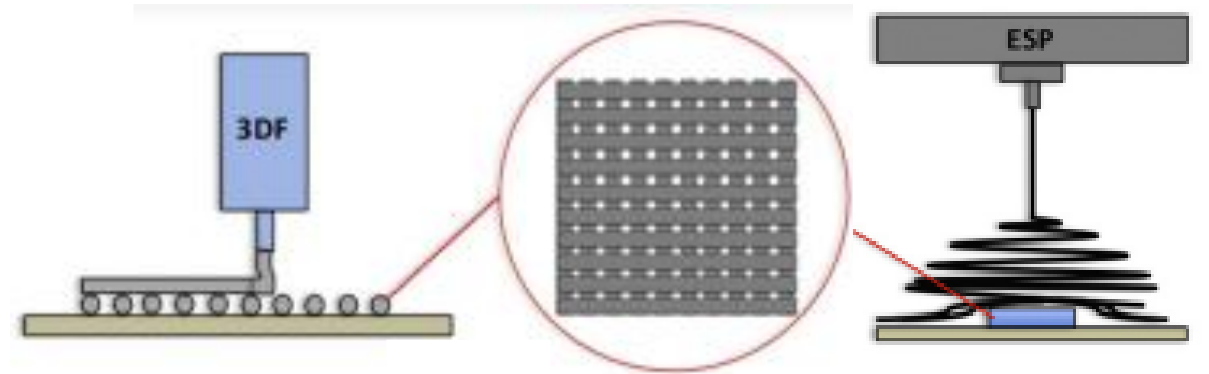
+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriale



Tecnologie ibride

Combinare differenti **tecnologie di additive manufacturing** per fabbricare **scaffold multiscala**

- Stampa 3D as estrusione + Stampa inkjet
- Stampa 3D as estrusione + electrospinning
- Stampa Inkjet + electrospinning

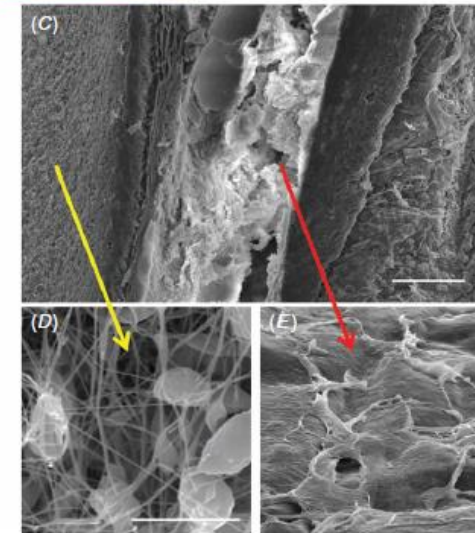
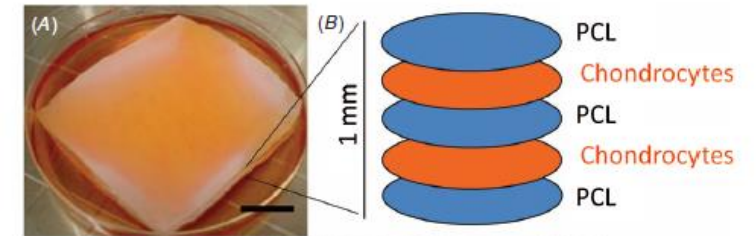
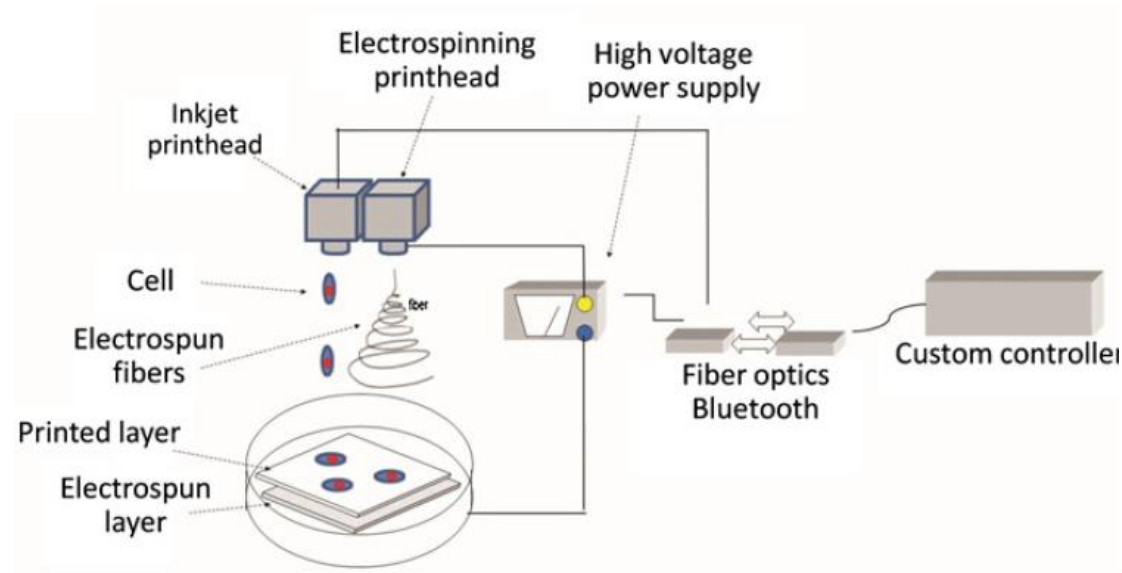


+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriale

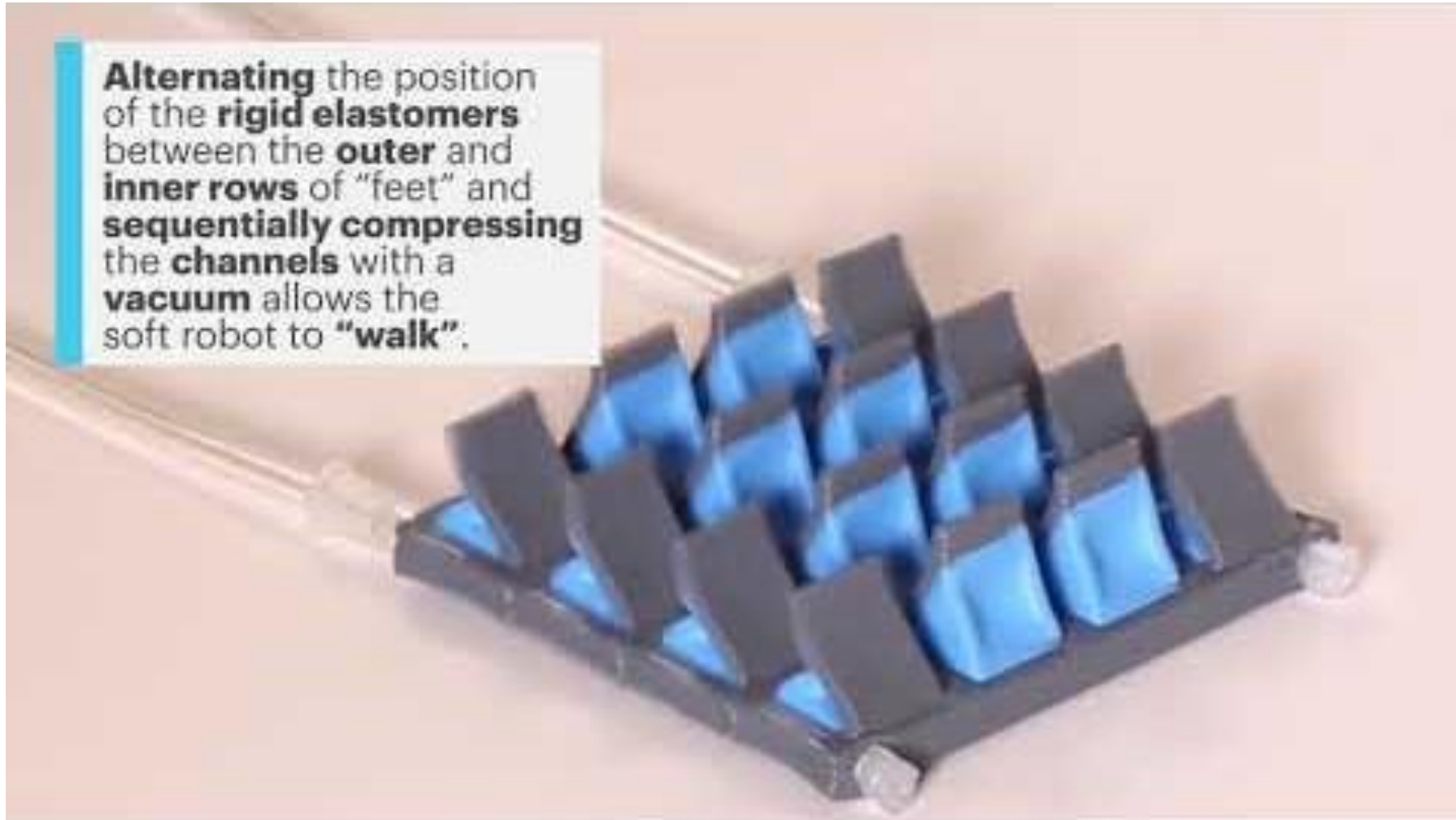
Tecnologie ibride

Combinare differenti **tecnologie di additive manufacturing** per fabbricare **scaffold multiscala**

- Stampa 3D as estrusione + Stampa inkjet
- Stampa 3D as estrusione + electrospinning
- Stampa Inkjet + electrospinning

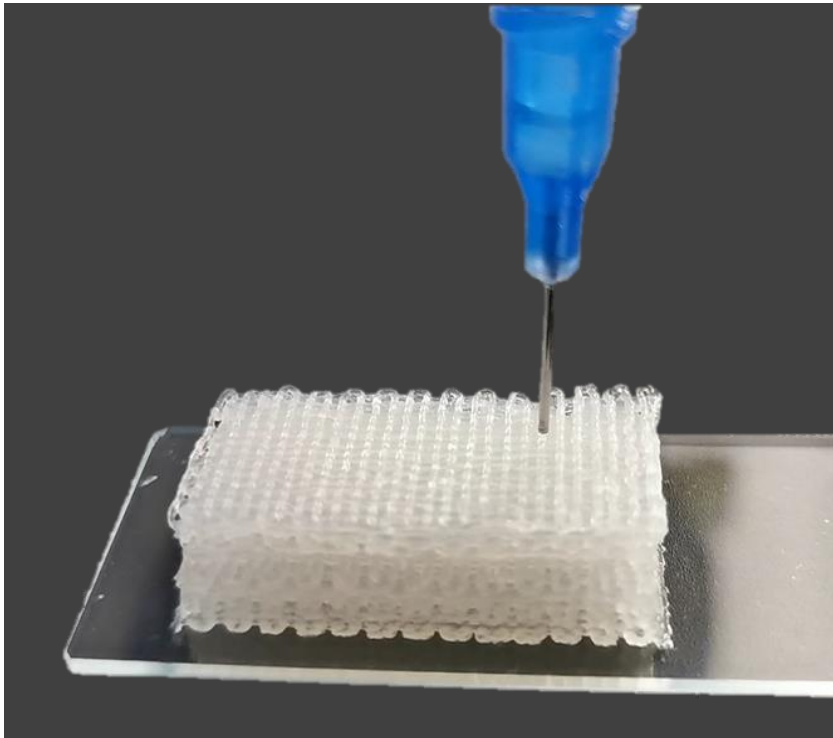


+ 3D Bioprinting multiscala e multimateriae

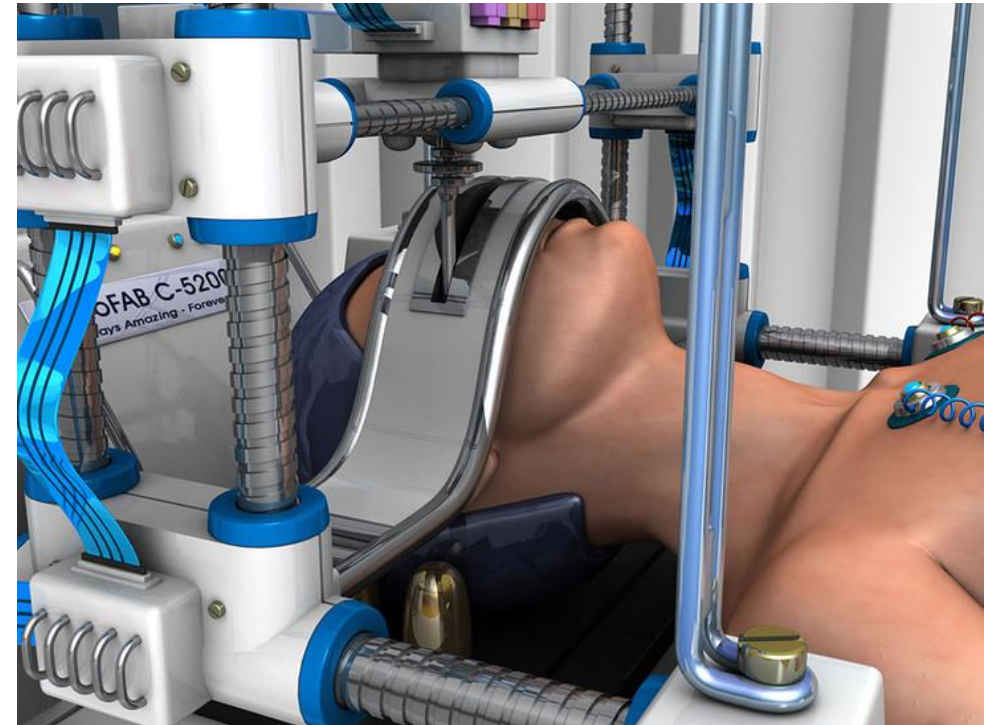


+ In situ bioprinting

***In vitro* bioprinting (ingegneria dei tessuti scaffold-based):** fabbricazione di scaffold con tecniche di bioprinting.



***In situ* bioprinting:** deposizione diretta di materiale biologico dentro e sopra il sito danneggiato, seguendo pattern predefiniti, direttamente in sala operatoria



+ In situ bioprinting



Limitazioni dell'ingegneria dei tessuti scaffold-based:

- È necessario l'utilizzo di bioreattori per creare unità funzionali per la sostituzione di organi e tessuti
- Necessità di manipolazione e impianto
 - Distruzione della micro- e macro-architetture del costrutto
 - Rischio di contaminazione
 - Necessità di un ambiente altamente sterile
- La forma e la morfologia dello scaffold differiscono dalla forma del sito di danno
 - Durata dell'impianto chirurgico elevato
 - Problemi legati all'ancoraggio meccanico dello scaffold al tessuto nativo

+ In situ bioprinting



PROS:

- Il copro stesso del paziente funge da bioreattore → non è necessario creare un ambiente artificiale di cultura
- La stampante ha accesso diretto al corpo del paziente ed è in grado di fabbricare il costrutto direttamente nel sito danneggiato

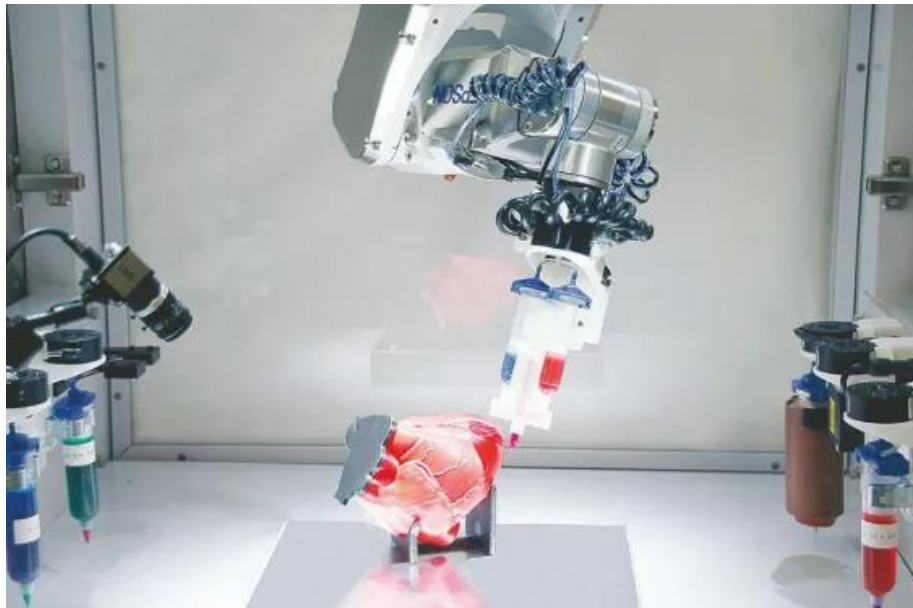
CONS:

- È necessario immobilizzare l'organo di interesse durante l'operazione
- Attualmente, soltanto gli organi superficiali possono essere potenzialmente trattati con questa tecnica (*e.g.* pelle, cartilagine, ossa)

+ In situ bioprinting

Bracci robotici

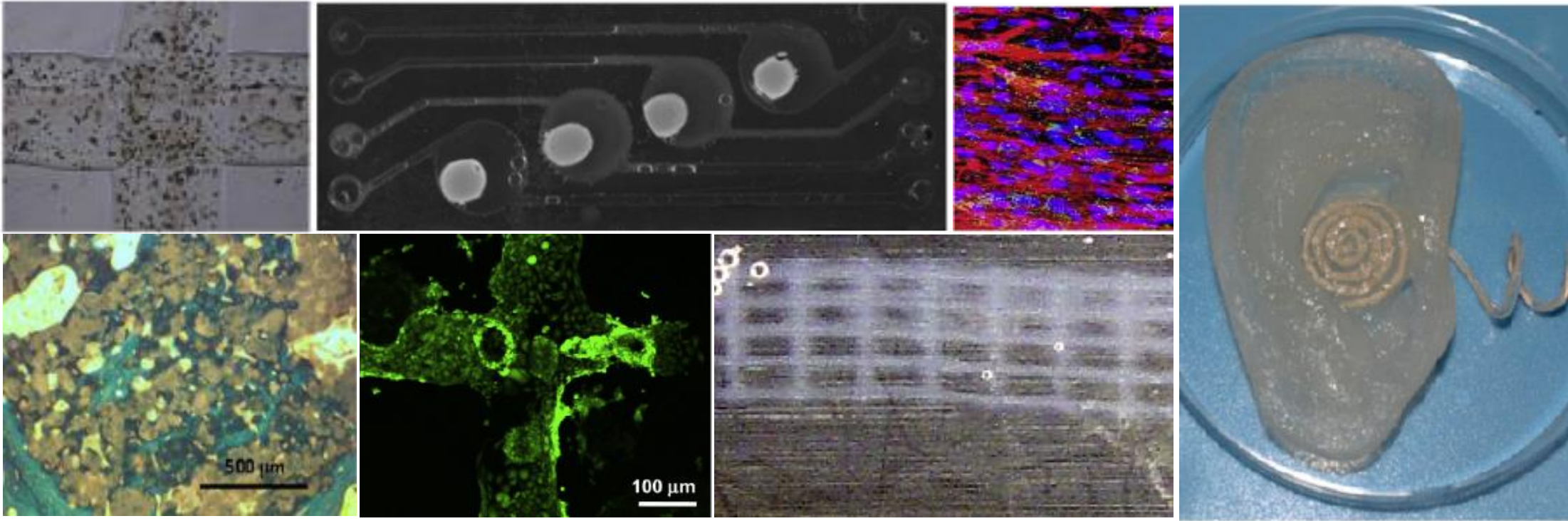
- Bracci robotici ad n-gradi di libertà dotati di un sistema di estrusione
- Possibilità di costruire traiettorie di stampa attraverso software CAD/CAM



Sistemi hand-held

- Sistemi portatili dotati di un unità di estrusione
- Libertà di depositare bioink
- Basso costo, competenza e libertà di movimento





Sistemi di cultura cellulare

- *Bioreattori*

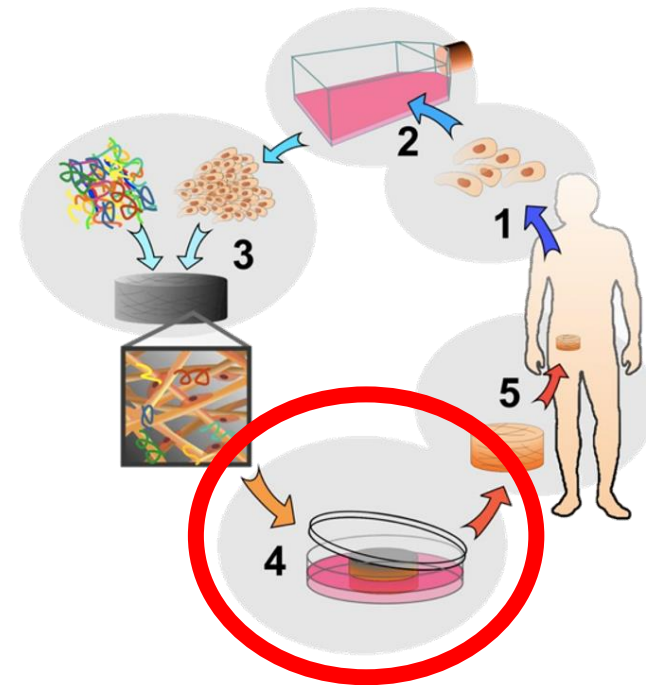
+ Tipologie di coltura

Una volta **fabbricati**, gli **scaffold vengono seminati con le cellule**, e il costrutto scaffold + cellule viene generalmente **coltivato *in vitro*** per permettere la **formazione del tessuto artificiale**.

Sistemi di coltura cellulare:

1. Statici

2. Dinamici



+ Tipologie di coltura: coltura statica

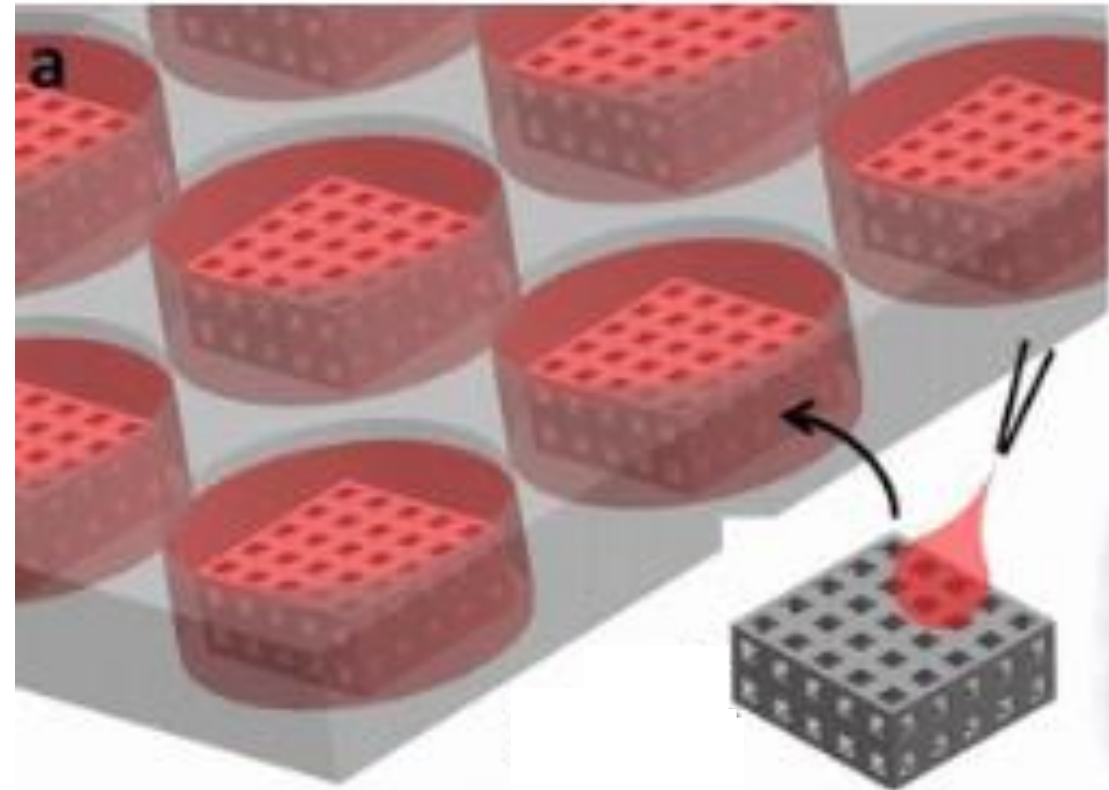
Il costrutto (scaffold + cellule) viene inserito all'interno di **piastre di Petri o Piastre multipozzetto**. Le piastre vengono poi riempite con **mezzo di cultura** contenente nutrienti e **fattori di crescita**. Le piastre vengono poi poste e mantenute all'interno di un **incubatore** ($T=37^{\circ}\text{C}$, ambiente umido e CO_2 al 5%). È necessario cambiare il mezzo ogni 2-3 giorni



Piastre multipozzetto



Piastre di Petri



+ Tipologie di coltura: coltura statica



Vantaggi:

- Facilità di utilizzo e manipolazione
- Minore probabilità di contaminazione
- Minor ingombro
- ...

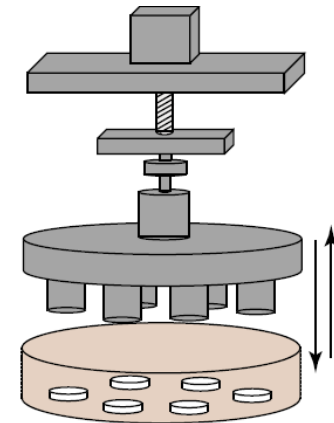
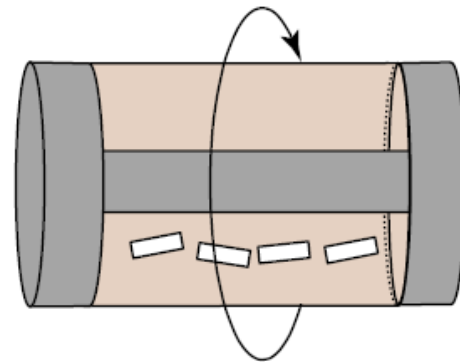
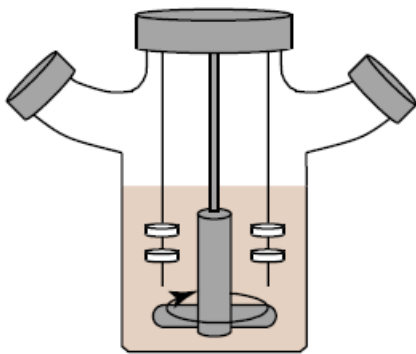
Svantaggi:

- L'apporto di nutrienti, soprattutto dell'ossigeno, è limitato alla sola diffusione.
- Non forniscono stimoli
-

+ Tipologie di coltura: coltura dinamica



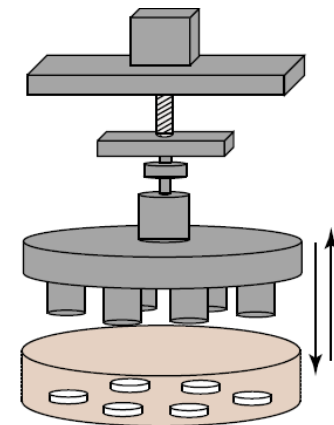
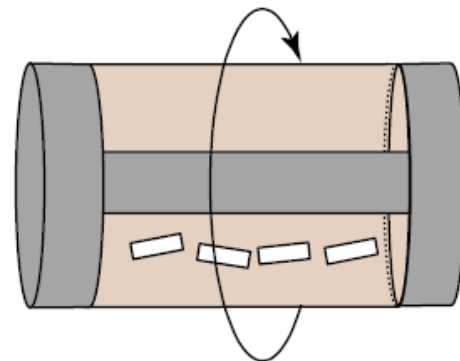
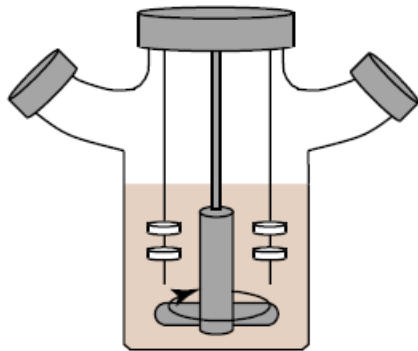
- Sistemi di coltura dinamica utilizzano i **bioreattori**: dispositivi **sterili** all'interno dei quali viene coltivato il costrutto e che promuovono la crescita del tessuto artificiale in **condizioni dinamiche altamente controllabili**.
- I **bioreattori** sono dei “**simulatori di organismi viventi**”, che presentano un **flusso di nutrienti e prodotti di scarto** che simula ciò che accade nel nostro **sistema vascolare**



+ Tipologie di coltura: coltura dinamica

Nella definizione più generale i **bioreattori** sono **sistemi di coltura in vitro**, progettati per eseguire almeno una delle seguenti azioni:

- Permettere un'**uniforme distribuzione cellulare** sugli scaffold
- Mantenere una **desiderata e costante concentrazione di gas e nutrienti nel mezzo di coltura**
- Fornire un **trasporto di massa efficiente** (unendo alla diffusione la convezione)
- Esporre il tessuto in formazione a **stimoli fisici**



+ Tipologie di coltura: coltura dinamica



Vantaggi:

- Le cellule crescono in un **sistema dinamico** che simula meglio ciò che accade in vivo, imponendo ad esempio un flusso controllato di mezzo di coltura
- È possibile fornire **stimoli fisici** alle cellule in coltura
- È possibile **controllare finemente** alcuni **parametri fondamentali** (es: temperature, pH, concentrazione di O₂, sforzi di taglio) dotando i bioreattori di appositi sensori
- È possibile coltivare **tipi cellulari diversi** con **mezzi di coltura diversi**

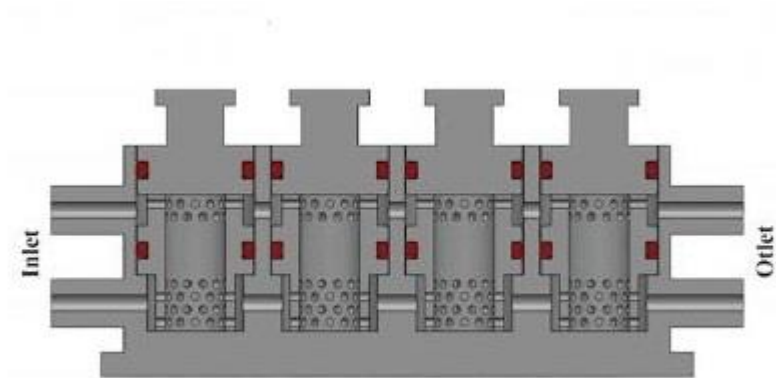
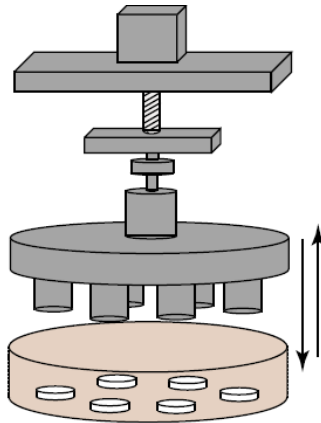
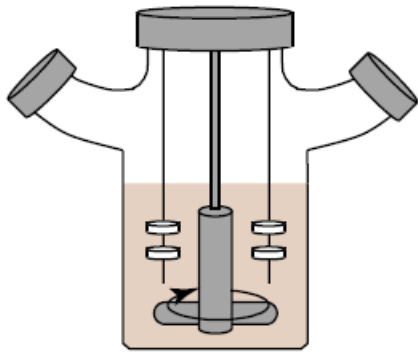
Svantaggi:

- Maggiore ingombro
- Difficoltà di manipolazione
- Problemi di sterilità
- Difficoltà di progettazione
- ...

+ Bioreattori: tipologie

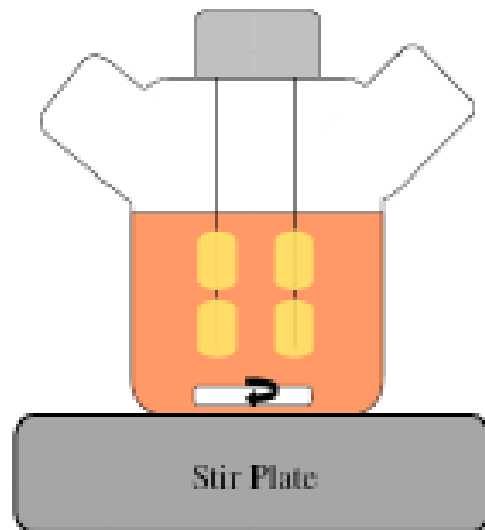
I bioreattori possono essere classificati in:

- **Bioreattori con agitazione**
- **Bioreattori** in grado di fornire **stimoli fisici** (es: sforzi di taglio, pressione, compressione)
- **Bioreattori per connettere colture cellulari diverse**



+ Spinner flasks

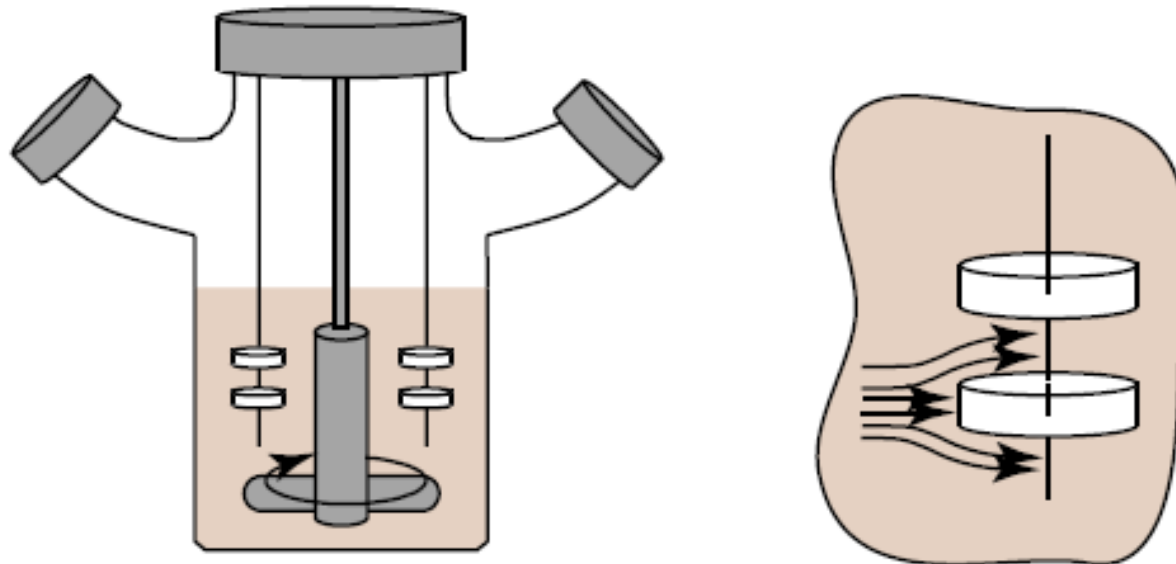
- Il principale esempio di bioreattori con agitazione sono le **spinner flasks**, in cui il **mezzo di coltura** è **agitato meccanicamente** attraverso una barretta magnetica messa in rotazione da un campo magnetico.
- L'agitazione può essere studiata o dimensionata per imporre stimoli di intensità nota



+ Spinner flasks

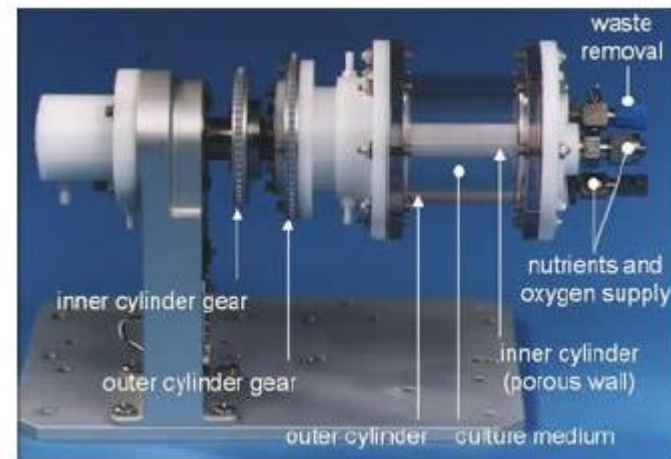
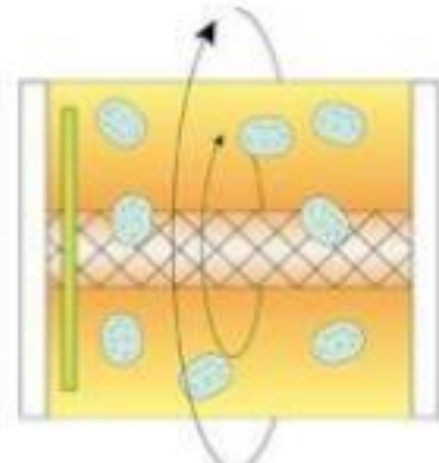


Le spinner flasks, vengono principalmente utilizzate per **ottenere una distribuzione uniforme delle cellule sugli scaffold**. Gli scaffold sono **tenuti sospesi** da appositi sostegni e **l'agitazione** mantiene le **cellule**, presenti nel mezzo, **in sospensione**, evitando che si sedimentino sul fondo. In questo modo **le cellule colonizzeranno gli scaffold in maniera uniforme**



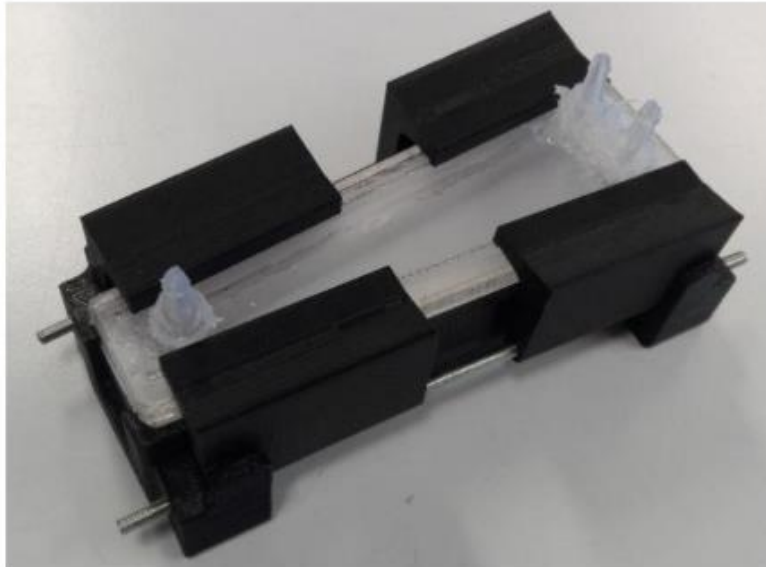
+ Bioreattori a parete rotante (NASA)

- I bioreattori a parete rotante sono costituiti da **due cilindri** cavi concentrici solidali allo stesso telaio che viene **messo in rotazione a velocità costante**. Il mezzo di cultura e i costrutti si trovano tra i due cilindri.
- La **parete interna** garantisce lo **scambio di gas** con l'ambiente esterno, essendo realizzata in **materiale gas-permeabile**
- Fu inizialmente sviluppato dalla NASA per studiare le culture cellulari in assenza di gravità



+ Bioreattori a perfusione

- Bioreattori più utilizzati, in cui il **mezzo di coltura** è **messo in circolo** all'interno di un circuito idraulico che comprende una **pompa**, una **riserva di mezzo di coltura** e la **camera che contiene i costrutti**.
- Generalmente si parla di perfusione diretta → in cui il mezzo attraversa il costrutto tramite i suoi pori.



+ Bioreattori in grado di fornire stimoli fisici

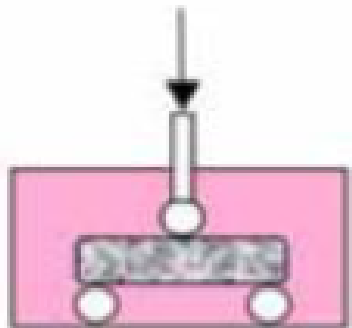
Bioreattori in grado di **imporre carichi fisiologici o sovrafisiologici** sui costrutti in coltura per **favorirne il differenziamento** o per **studiare il comportamento** cellulare in seguito a tali stimoli.



+ Bioreattori in grado di fornire stimoli fisici



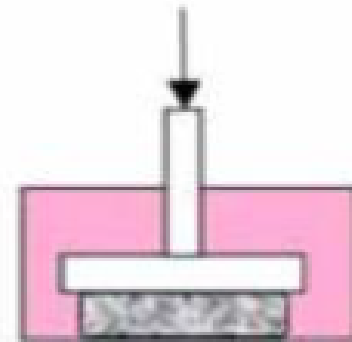
- La **stimolazione** è nota, **modellabile e finemente controllabile**.
- Gli stimoli applicabili possono essere diversi: sforzo di taglio, **compressione, trazione**, torsione.



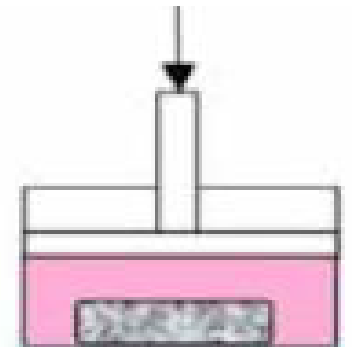
bending



tension



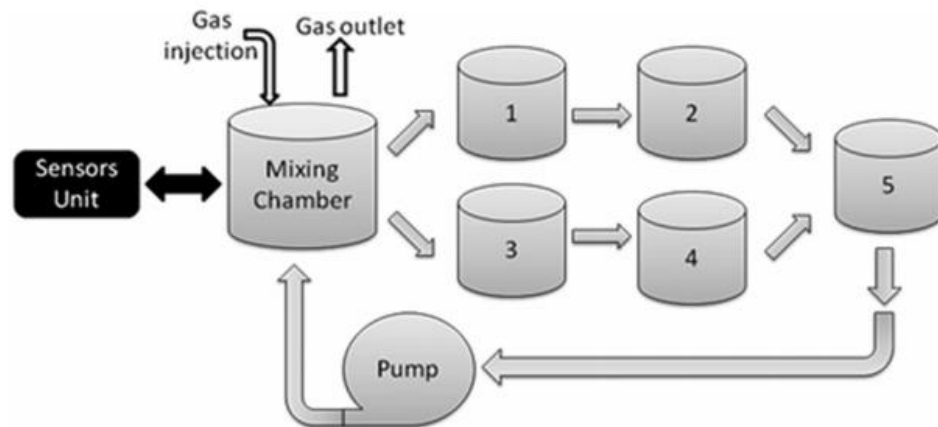
compression



hydrostatic pressure

+ Bioreattori per connettere colture cellulari diverse

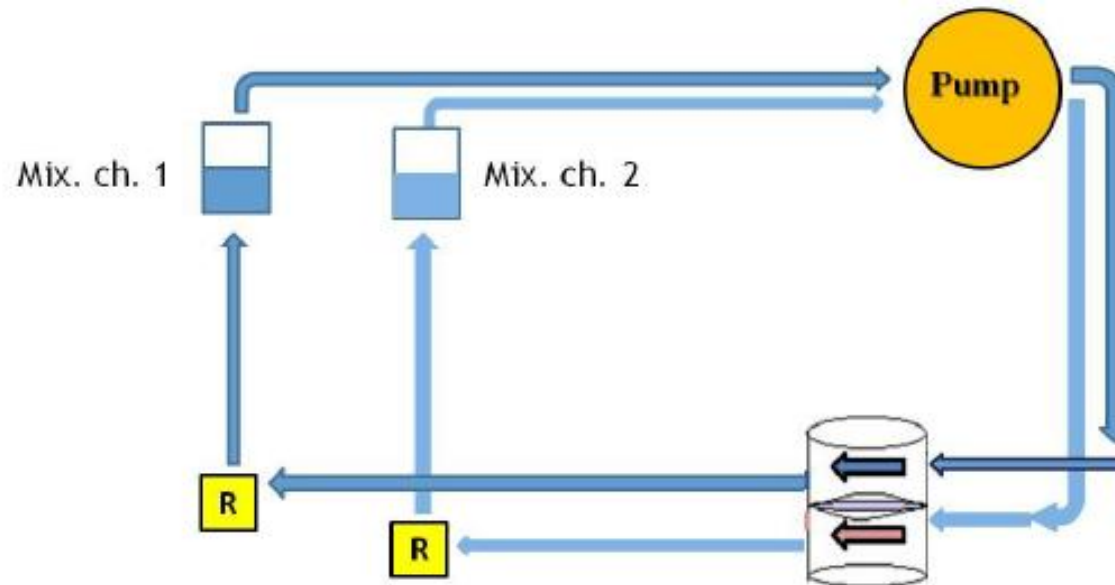
- È possibile **connettere colture cellulari** diverse attraverso l'uso di **bioreattori**.
- Il modo più immediato è attraverso l'**unione di single camera di coltura in un unico sistema**.
- Il **limite** principale di questo metodo è la possibilità di **usare un unico mezzo di coltura**.



+ Bioreattori per connettere culture cellulari diverse

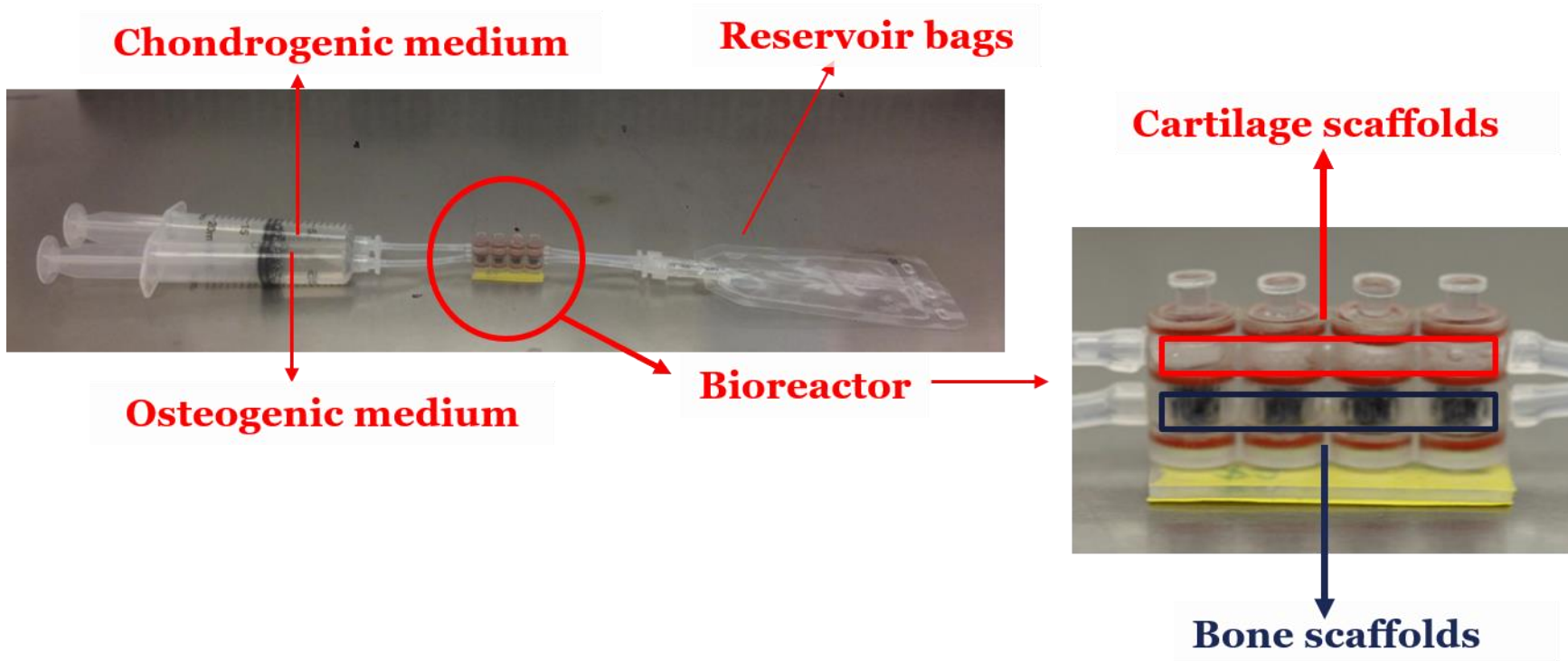


- **Bioreattori multicompartimentali:** bioreattori dotati di camere di cultura indipendenti (singoli **bioreattori a perfusione**), in cui è possibile coltivare costrutti diversi.
- L'unica connessione tra le due camera è attraverso i costrutti stessi; ciò permette di analizzare il cross-talk tra costrutti cellulari diversi



+ Bioreattori per connettere culture cellulari diverse

Bioreattore con doppia camera per la coltura di costrutti osteocondrali.



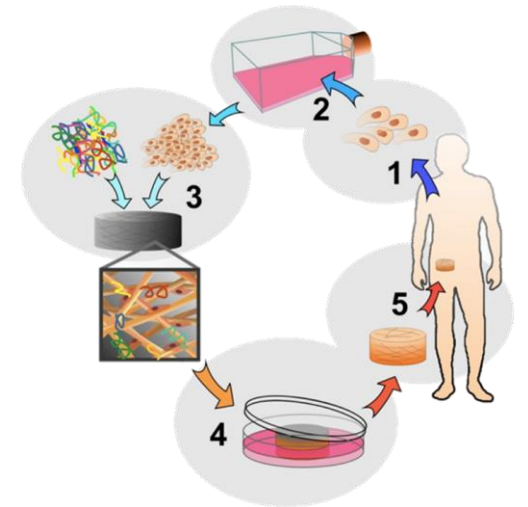
- Thomas P., et al. "Three-dimensional osteochondral microtissue to model pathogenesis of osteoarthritis." *Stem cell research & therapy* 4.S1 (2013): S6.e
- Lin, Hang, et al. "Stem cell-based microphysiological osteochondral system to model tissue response to interleukin-1 β ." *Molecular pharmaceutics* 11.7 (2014): 2203-2212.
- Alexander, Peter G., et al. "Three-dimensional osteogenic and chondrogenic systems to model osteochondral physiology and degenerative joint diseases." *Experimental biology and medicine* 239.9 (2014): 1080-1095.

+ Translazione clinica



Potenziali applicazione delle strutture **biostampate** in medicina:

1. Fornire **tessuti ingegnerizzati scalabili e personalizzati** in grado di **sostituire** tessuti e organi umani.
2. Sviluppo di modelli *in vitro*



+ Tessuti biostamapti per l'impianto

41 000

patients transplanted
last year



equivalent to the capacity
of the football stadiums
of Helsinki, Turin or Minsk



63%
kidney



24%
liver



6%
heart

48 000

new patients registered
on waiting lists for
transplantation last year



= nearly 6 new
patients added
every hour



18 patients die
every day

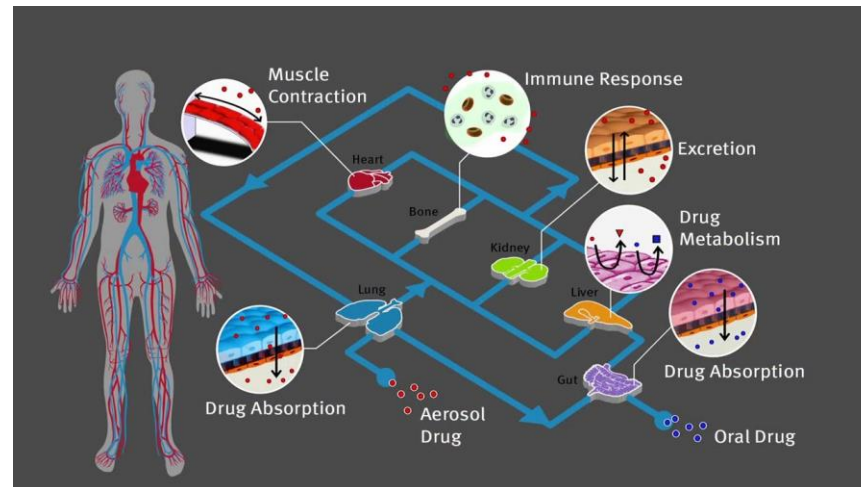
waiting for a
transplant



More than **6 000**
patients on waiting lists
died last year


+ Sviluppo di modelli *in vitro*

- Sviluppo **modelli *in vitro* veritieri** per studiare i **tessuti umani** in situazioni fisiologiche e patologiche utilizzando cellule umane e senza l'uso di animali.
- **Filosofia delle 3R** (*reducing, refining, and replacing*) supportata dalla **direttiva europea 2010/63**

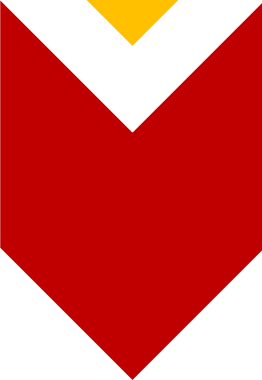


+ Translazione clinica: a che punto siamo?



- 
- Introduzione e ottimizzazione delle tecnologie di bioprinting
 - Identificazione dei biomateriali e delle cellule più idonee
 - Biofabbricazione e cultura in vitro
 - Caratterizzazione *in vitro*
 - Test *in vivo*

- 
- Framework legale e clinico
 - Trial clinici

- 
- Approvazione clinica
 - Scalabilità della tecnologia e riduzione dei costi
 - Equipaggiare gli ospedali con le tecnologie appropriate
 - Utilizzo giornaliero nella clinica

+ Translazione clinica: a che punto siamo?



Benchè esistano **dispositive medici stampati in 3D attualmente in commercio** (dispositive ortopedici personalizzati, guide chirurgiche, stent per le vie aeree), attualmente **non esiste alcun trial clinic su costrutti biostampati** contenenti **cellule umane**

<https://clinicaltrials.gov/>

+ Translazione clinica: a che punto siamo?

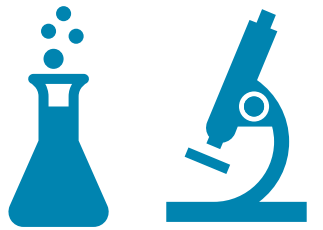


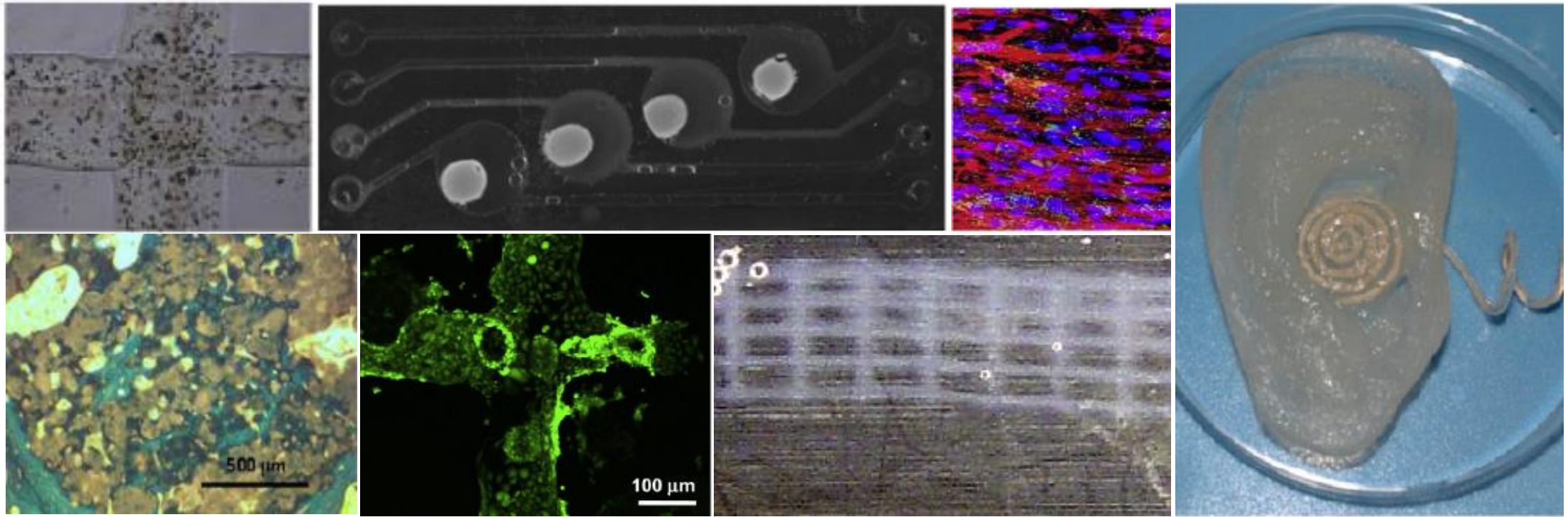
- Per la **pelle**, il bioprinting è vicino a diventare un metodo clinicamente rilevante per produrre **innesti cutanei** ed è già utilizzato nell'industria cosmetica.
- Sono in corso diversi studi clinici che utilizzano costrutti cellularizzati fabbricati con tecniche convenzionali e scaffold stampati in 3D senza cellule per l'**osso** e la **cartilagine**.
- Nessun trial clinico per strutture biostampate contenenti o no cellule per **tessuti molli/organi** (tessuto cardiaco, sistema nervoso centrale e periferico, reni, fegato, polmoni).
- Tra i tessuti molli, il **fegato** potrebbe essere il primo a vedere un ruolo clinico del sostituto biostampati.
- Le guide biostampate per la riparazione dei **nervi periferici** sono vicine alla valutazione clinica

+ Translazione clinica: a che punto siamo?

Fattori scientifici che limitano la traslazione clinica delle strutture biostampate:

- Necessità di **materiali strutturalmente e biologicamente compatibili**
- Di solito, i mezzi di **coltura cellulare** e i **biomateriali** utilizzati coinvolgono componenti di **derivazione animale** e possono causare una risposta immunitaria dopo il trapianto.
- Difficoltà nell'uso delle **cellule staminali** hanno il potenziale di formare **teratomi**
- Indurre la **vascolarizzazione** e l'**innervazione** nei costrutti 3D
- Ricostruire la **struttura gerarchica, multi-materiale e multi-cellulare** del tessuto nativo
- **Vitalità a lungo termine** e integrazione con il tessuto ospite
- **Integrazione elettrica** per i tessuti muscolari cardiaci e scheletrici





Modelli in vitro ottenuti tramite stampa 3D

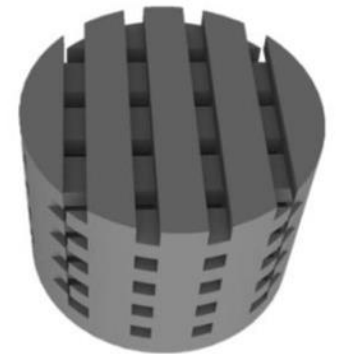
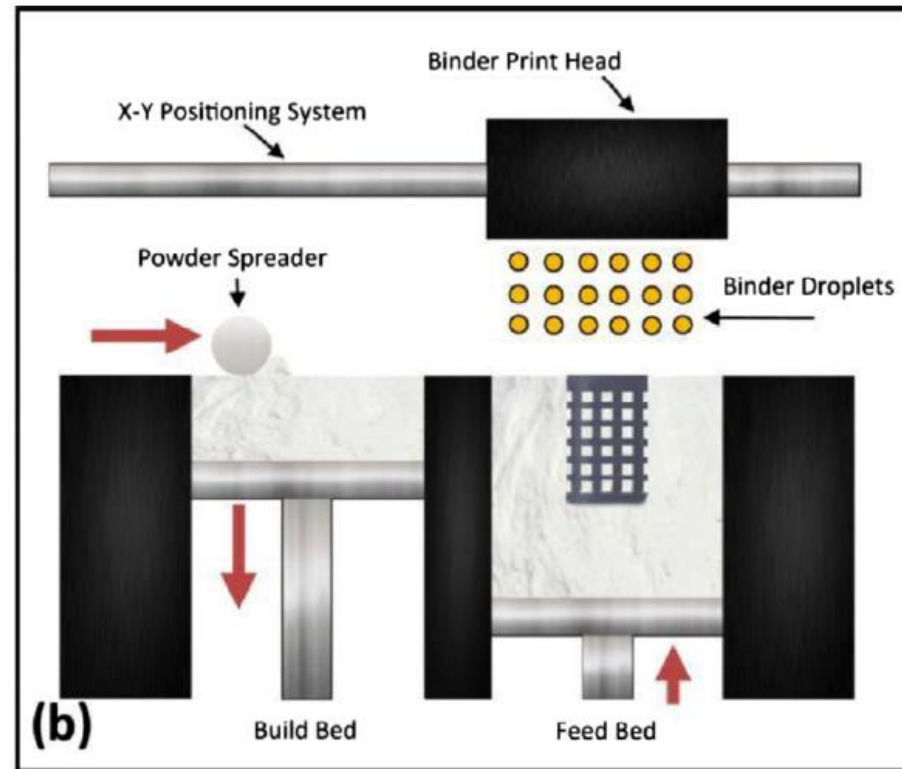
Rilevanti studi in letteratura

+ Tessuto osseo

SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensional printed tricalcium phosphate scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis *in vivo*

Gary Fielding, Susmita Bose

- Tecnica di bioprinting: 3D printing (getto di collante)
- Biomateriale: mixture di β -tricalcio fosfato e ossido di zinco (materiale ceramico)
- Tipologia di costrutto: scaffold wood-pile con pori di (317 μm)
- Tipo di studio: Impianto in un modello murino per 16 settimane



+ Tessuto osseo

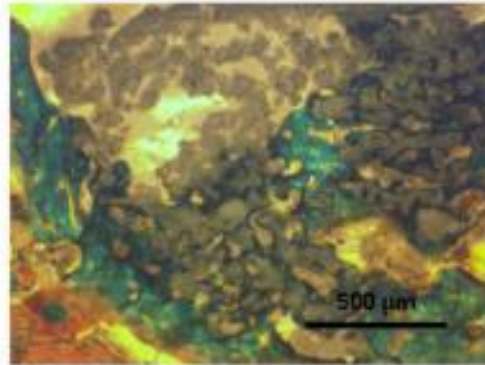
SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensional printed tricalcium phosphate scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis *in vivo*

Gary Fielding, Susmita Bose

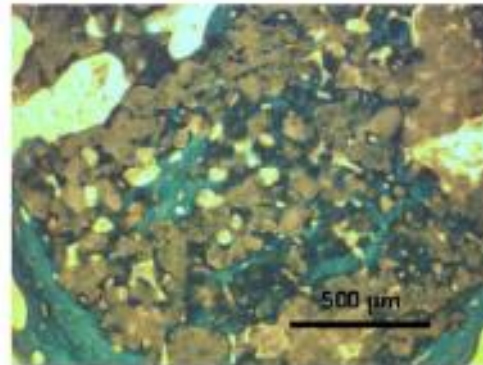


1. Formazione di nuovo tessuto osseo

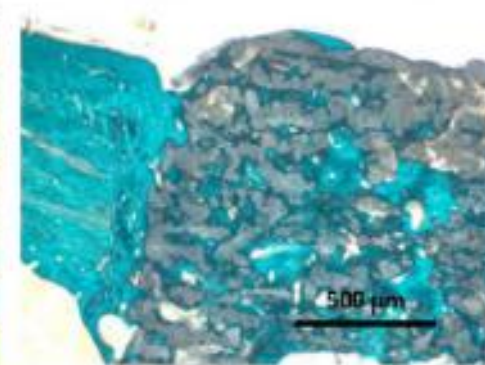
6 Weeks



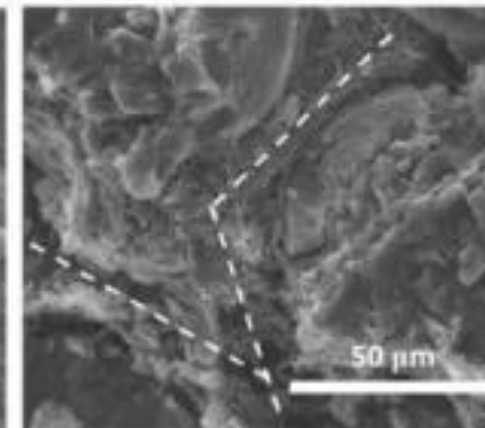
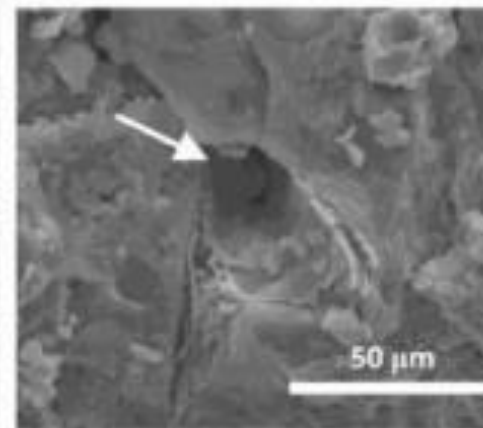
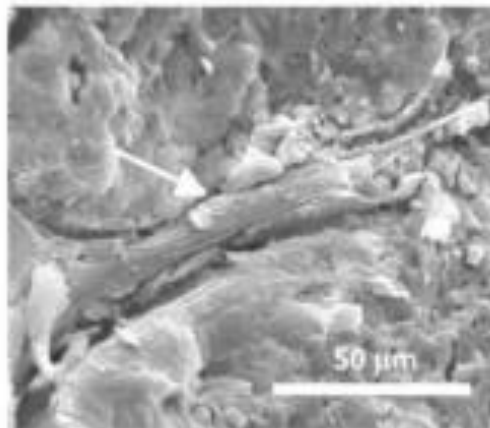
8 Weeks



12 Weeks



2. Angiogenesi

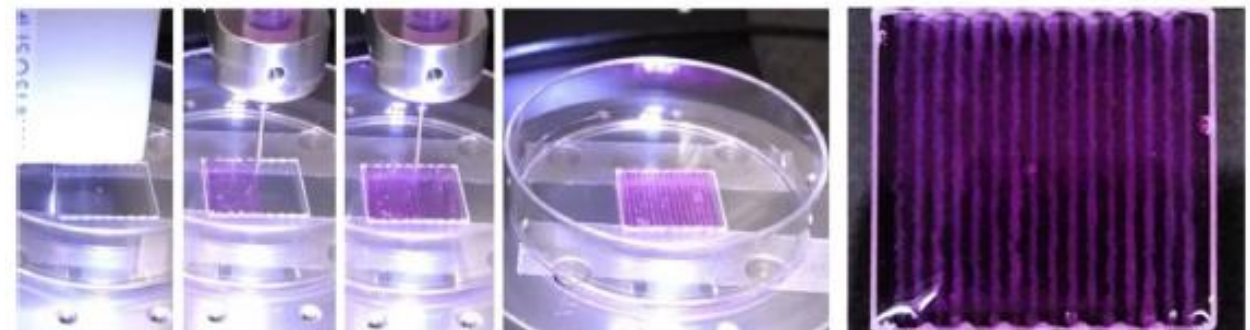
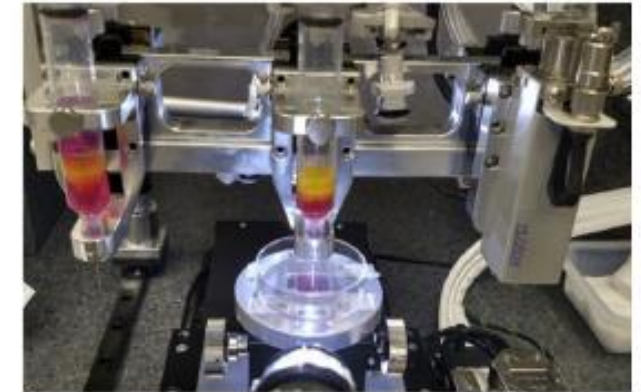
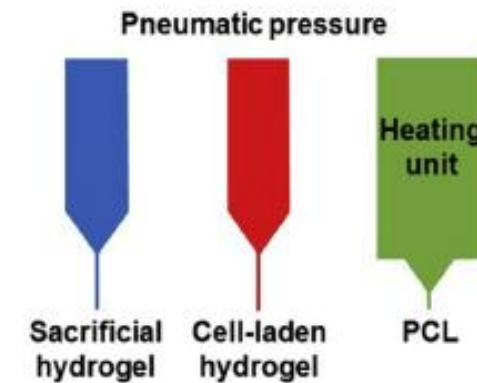
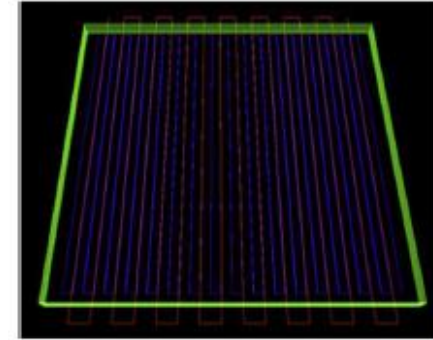


+ Tessuto cardiaco

3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs

Zhan Wang, Sang Jin Lee, Heng-Jie Cheng, James J. Yoo, Anthony Atala

- Tecnica di bioprinting: stampa 3D ad estrusione con dispensatore multiplo
- Biomateriale:
 - bioink formato da hydrogel a base di fibrinogeno contenente cardiomiociti
 - Hydrogel di origine naturale come materiale sacrificale
 - PCL come framework
- Tipologia di costrutto: patch a stringhe
- Tipo di studio: cultura *in vitro* per settimane



+ Tessuto cardiaco

3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs

Zhan Wang, Sang Jin Lee, Heng-Jie Cheng, James J. Yoo, Anthony Atala

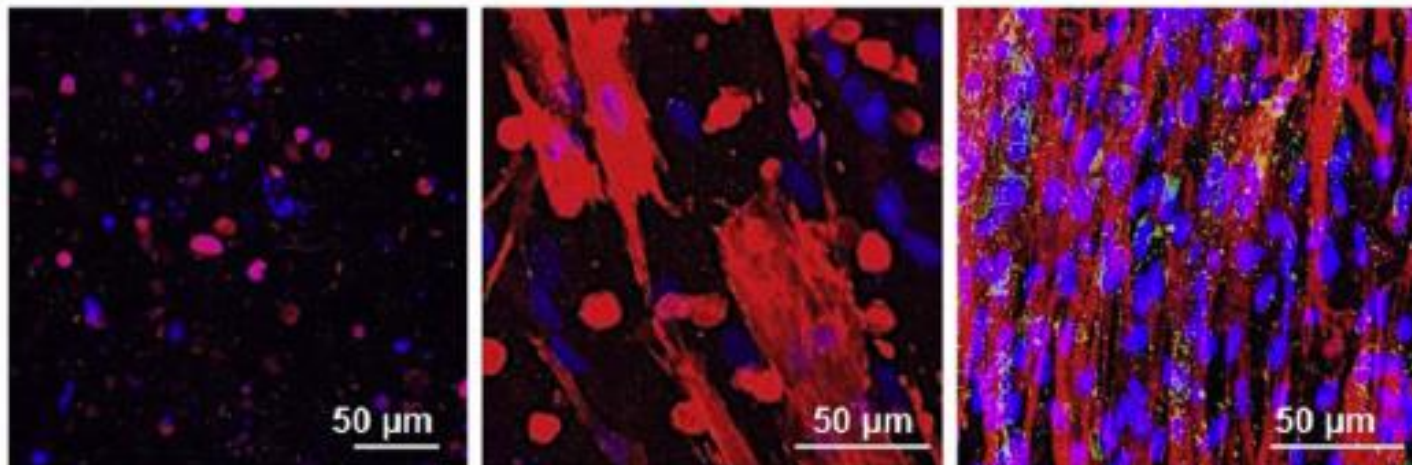


1. Allineamento delle fibre di α -actina.

Day 4

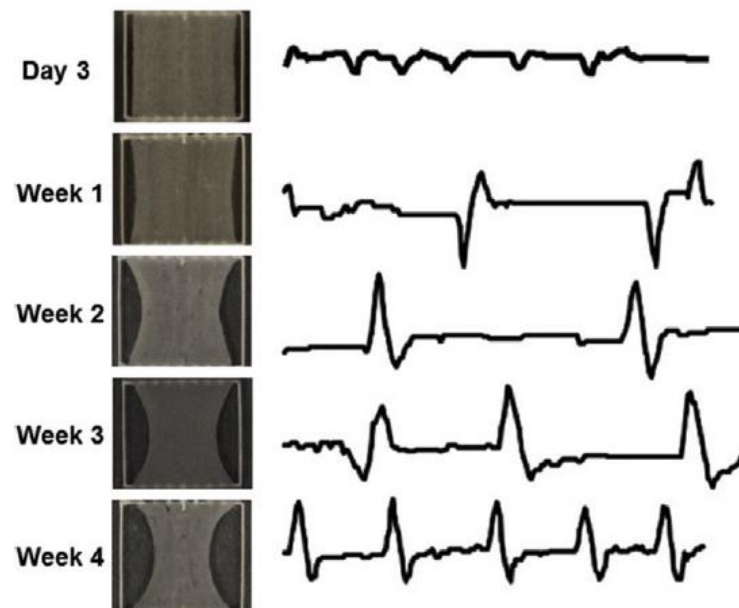
Week 1

Week 3 (low)



Rosso: α -actina Blu: nuclei

2. Contrazione spontanea e periodica.



Tessuto cardiaco

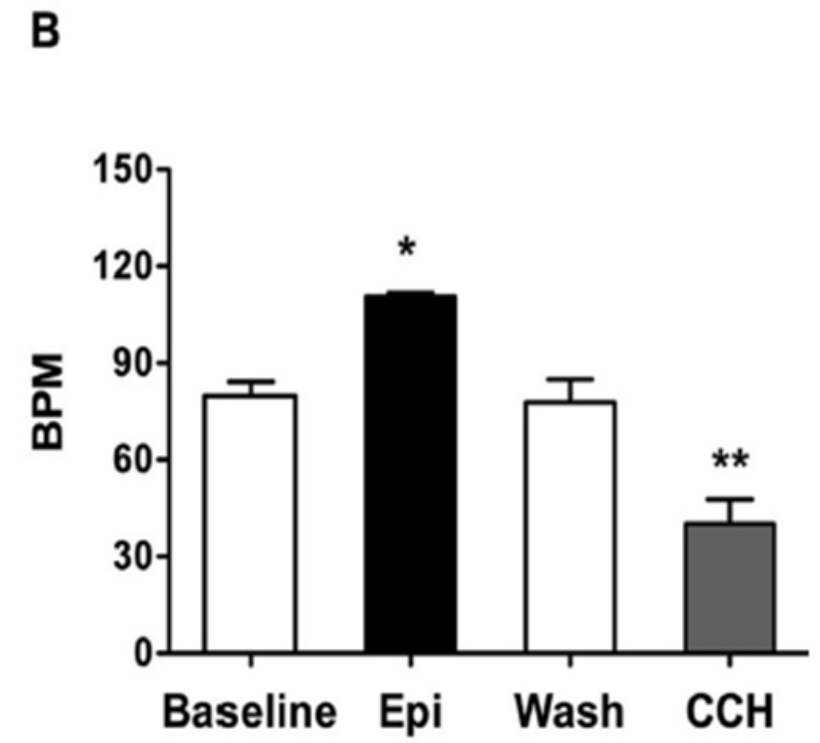
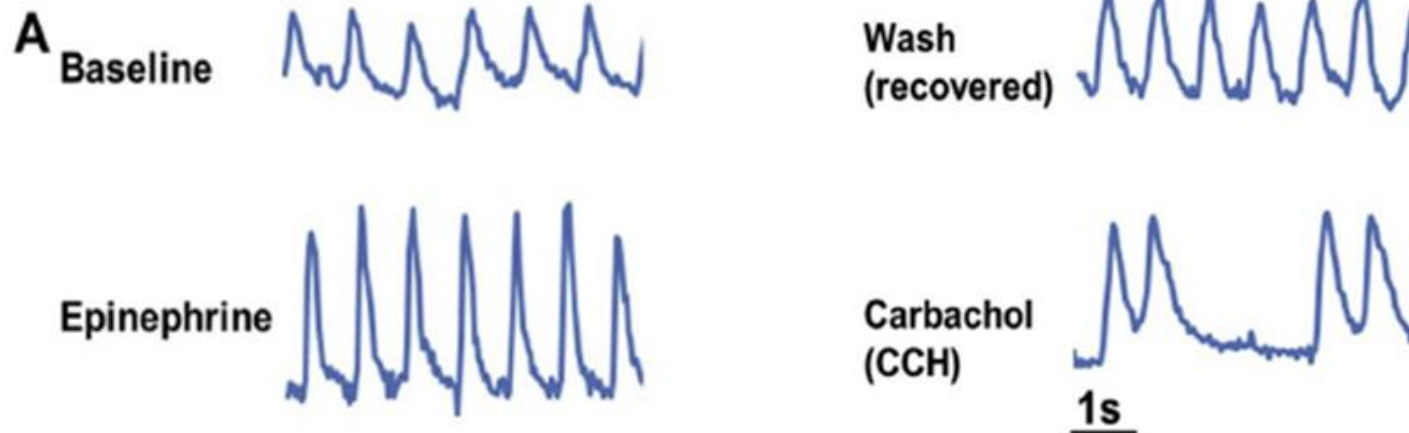


3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs

Zhan Wang, Sang Jin Lee, Heng-Jie Cheng, James J. Yoo, Anthony Atala



3. Risposta fisiologica a farmaci noti

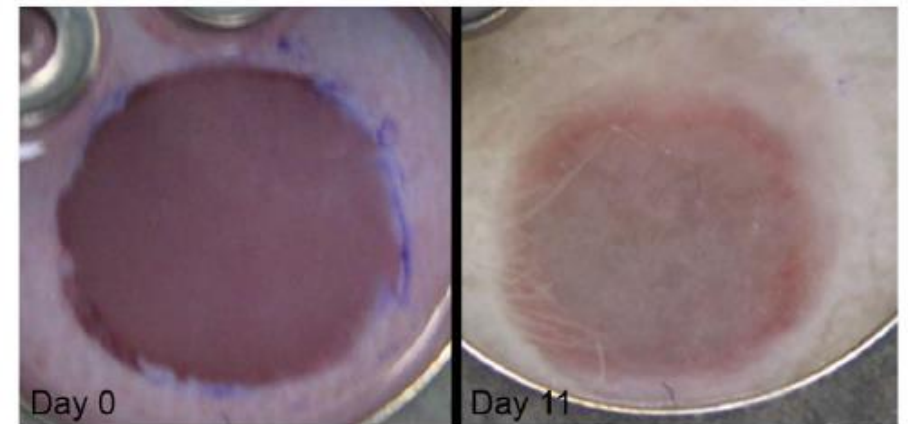
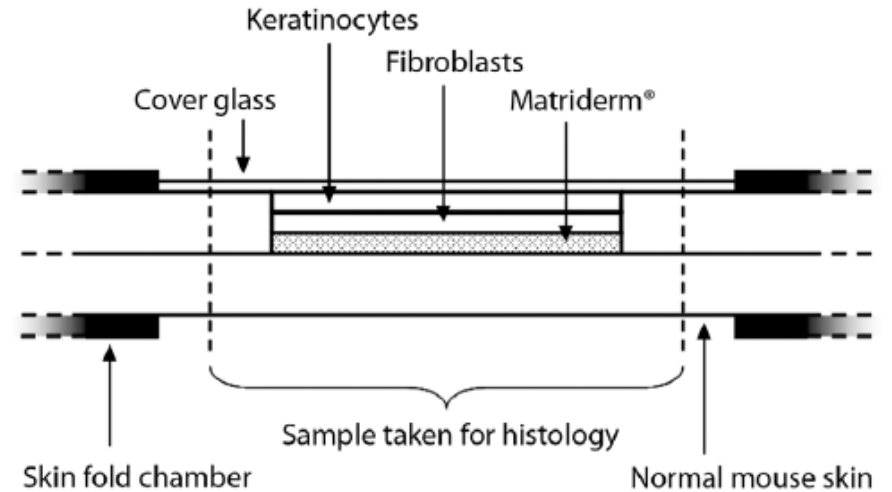


+ Pelle

Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser- Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice

Stefanie Michael, Heiko Sorg, Claas-Tido Peck, Lothar Koch, Andrea Deiwick, et al.

- Tecnica di bioprinting: Liquid induced transfer forward
 - Substrato assorbente: oro
 - Target: **cheratinociti** e **fibroblasti** sospesi in una soluzione di collagene
 - Substrato ricevente: Matriderm
- Tipologia di costrutto: costrutto completamente cellularizzato
- Tipo di studio: test *in vivo* per 11 giorni (ferita a tutto spessore nel dorso di campioni murini)



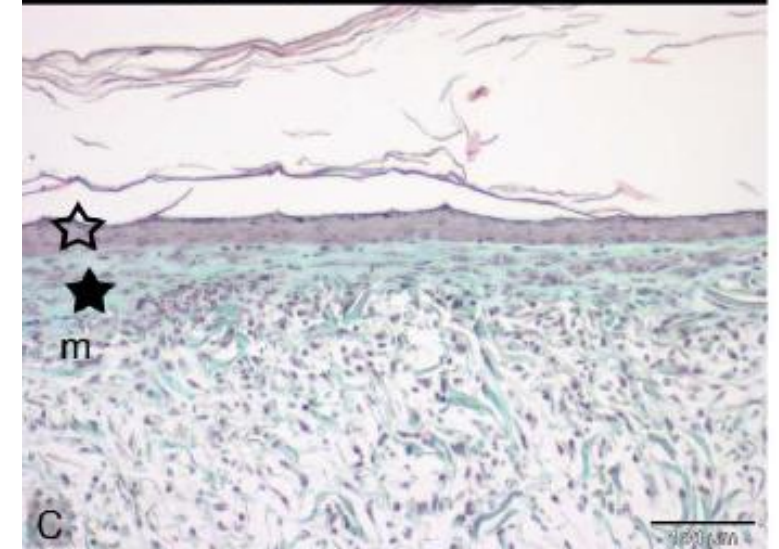
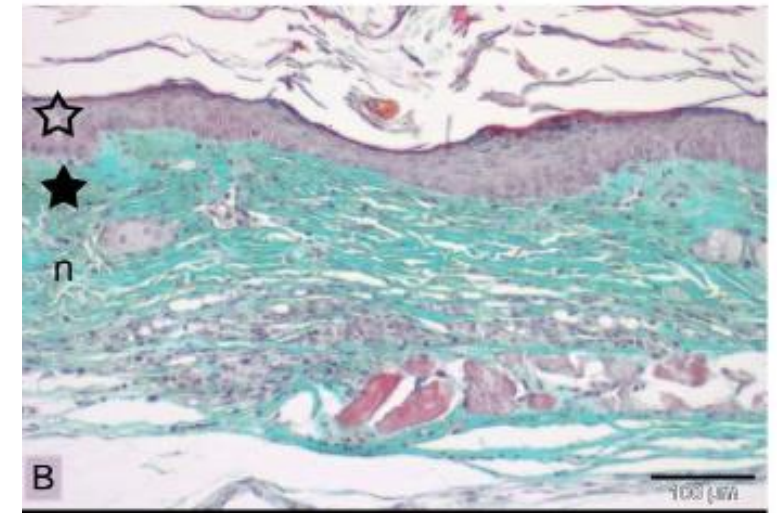
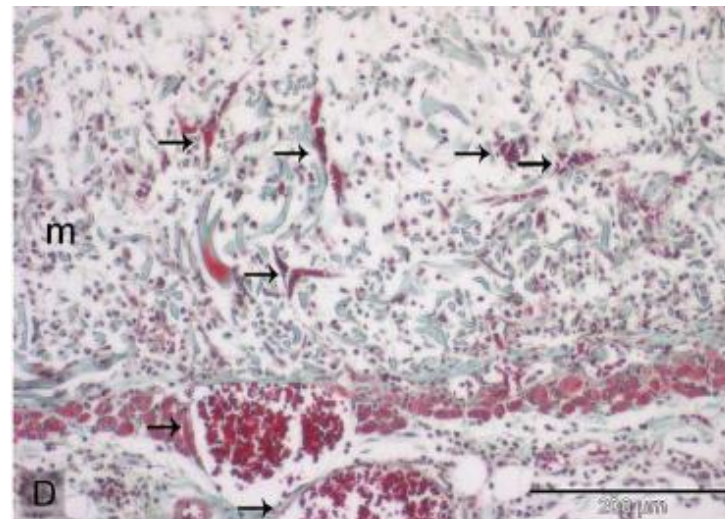
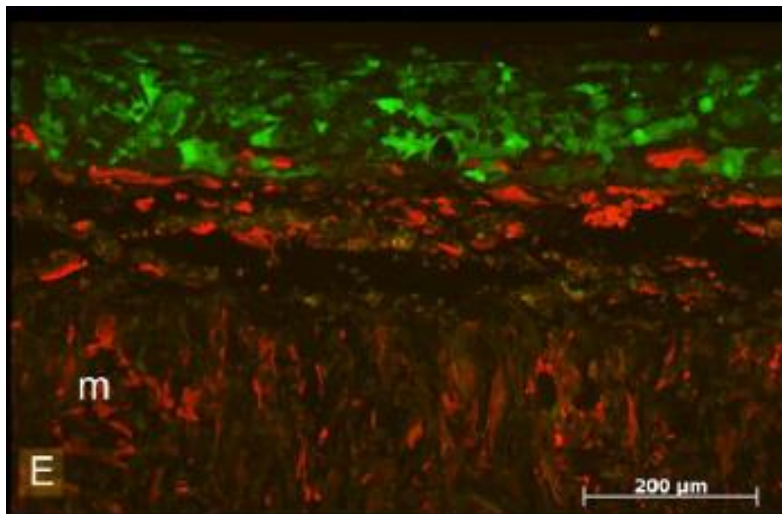
Pelle



Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser- Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice

Stefanie Michael, Heiko Sorg, Claas-Tido Peck, Lothar Koch, Andrea Deiwick, et al.

1. Formazione di uno **strato denso di cheratinociti** che mima lo strato corneo dell'epidermide
2. Deposizione di **collagene di tipo 1** da parte dei **fibroblasti**, che mima ciò che accade nel tessuto nativo
3. Colonizzazione della parte inferiore del costrutto da parte di cellule endoteliali → **angiogenesi**



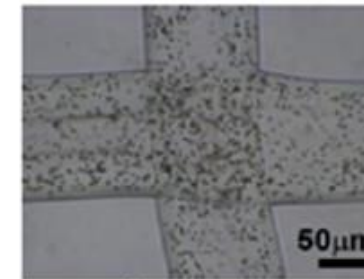
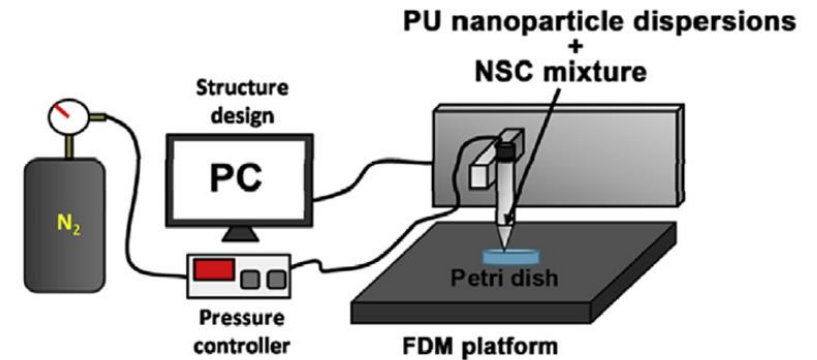
Tessuto nervoso

- + 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair

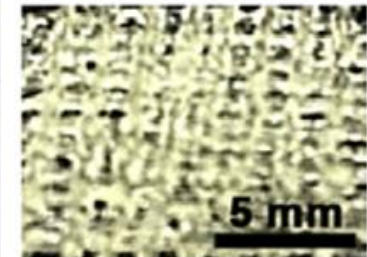
Fu-Yu Hsieh, Hsin-Hua Lin, Shan-hui Hsu



- Tecnica di bioprinting: stampa 3D ad estrusione con controllo in pressione
- Bioink: hydrogel a base di poliuretano all'interno del quale sono state disperse cellule staminali neurali
- Tipologia di costrutto: scaffold con 8 strati a griglia
- Tipo di studio: test *in vitro* e *in vivo* in embrioni di zebrafish e in zebrafish adulti, entrambi con sistema nervoso danneggiato



2-layer



8-layer

Tessuto nervoso

+ 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair

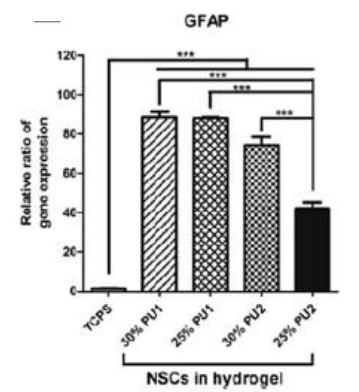
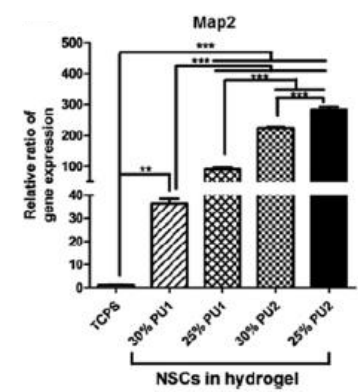
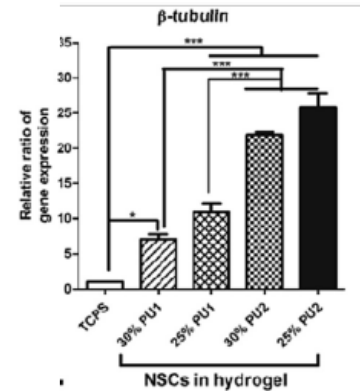
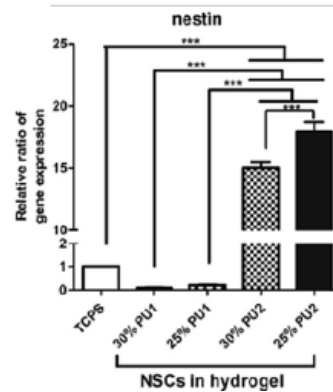
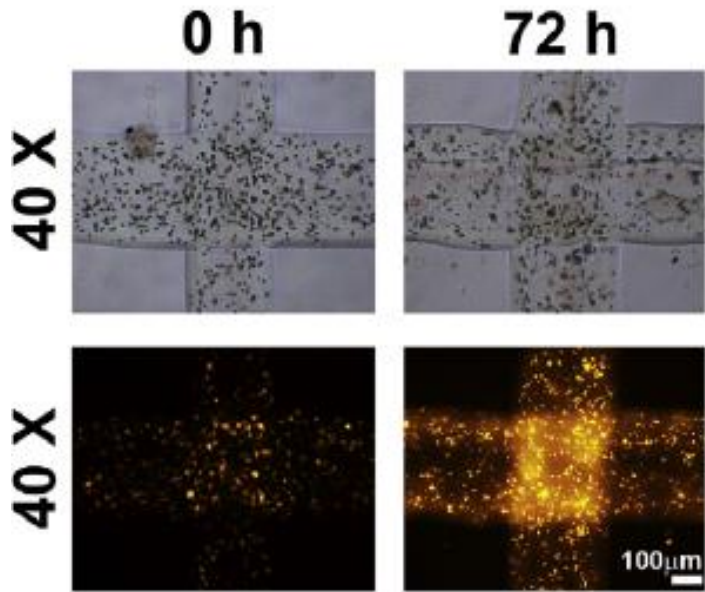
Fu-Yu Hsieh, Hsin-Hua Lin, Shan-hui Hsu



TEST IN VITRO

1. Aumento della proliferazione e della attività cellulare nel tempo

2. Differenziamento delle cellule staminali neurali in cellule nervosa mature



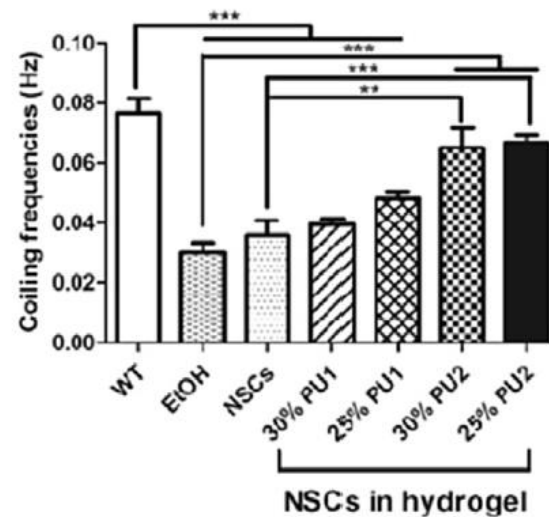
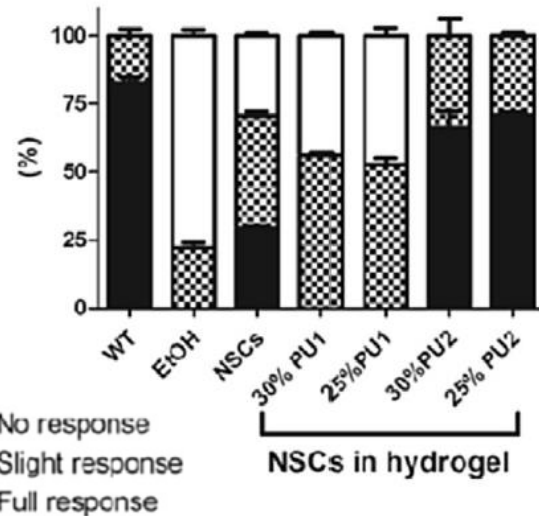
Tessuto nervoso

+ 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair
Fu-Yu Hsieh, Hsin-Hua Lin, Shan-hui Hsu

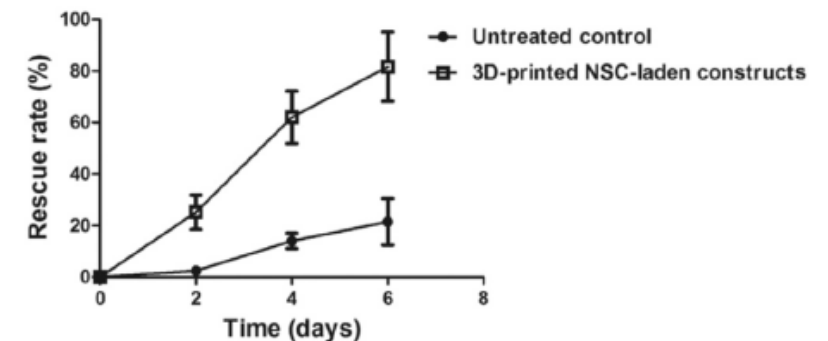
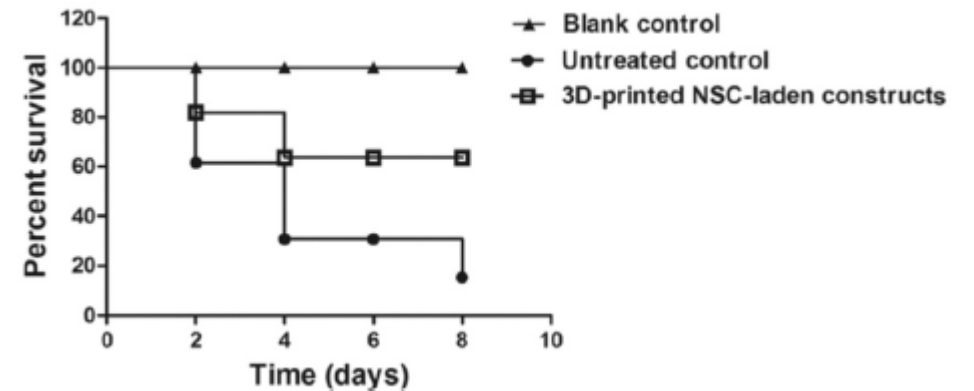


TEST IN VIVO

1. Recupero parziale della contrazione spontanea dell'embrione, anche in termini di frequenza negli embrioni di zebrafish



2. Frequenza di sopravvivenza e recupero delle funzionalità motorie in zebrafish adulti

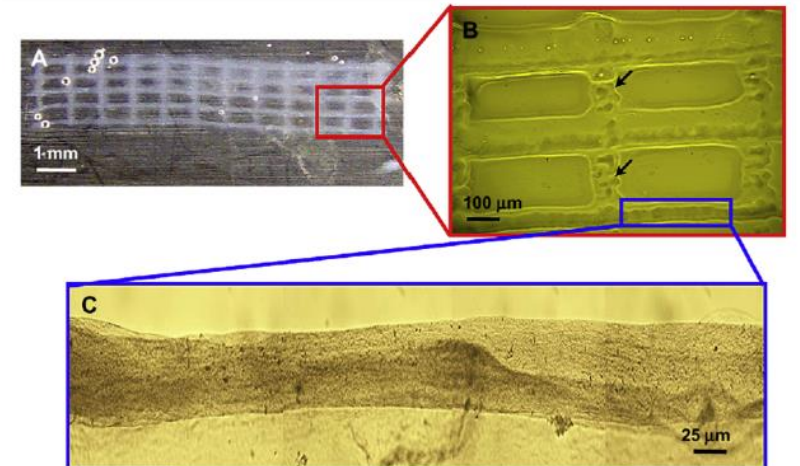
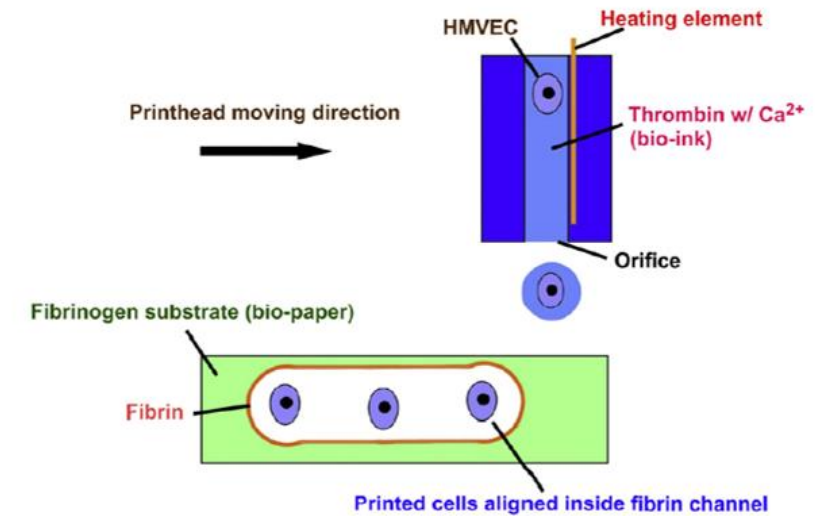


Sistema vascolare

+ Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology

Xiaofeng Cui, Thomas Boland

- Tecnica di bioprinting: stampa inkjet drop on demand termica
- Bioink: soluzione di trombina in cloruro di calcio contenente cellule endoteliali microvascolari umane
- Substrato ricevente: Fibrinogeno
- Tipologia di costrutto: strutture a griglia 2D
- Tipo di studio: test *in vitro*

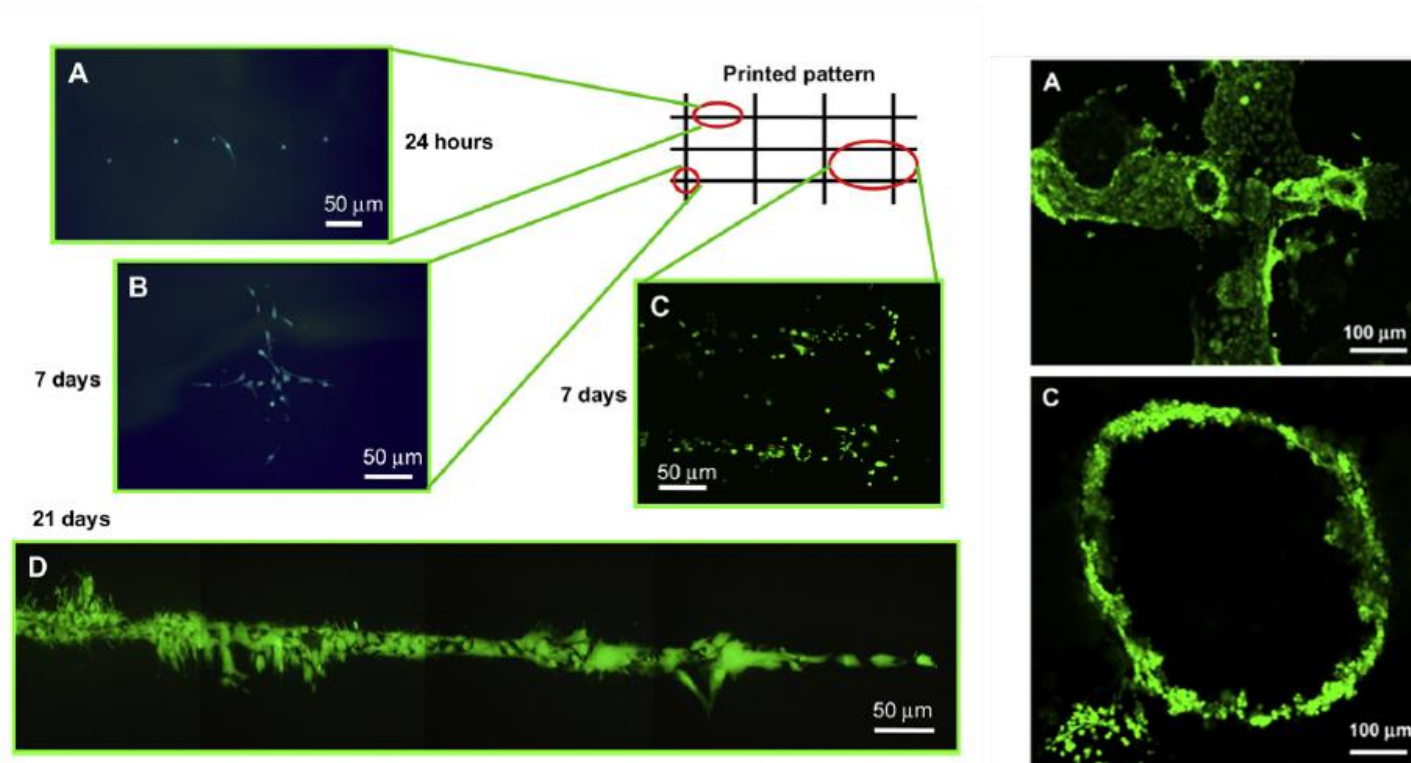


Sistema vascolare

- + Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology

Xiaofeng Cui, Thomas Boland

Le cellule endoteliali sono state in grado di proliferare e formare strutture tubulari dopo 21 giorni di coltura *in vitro*



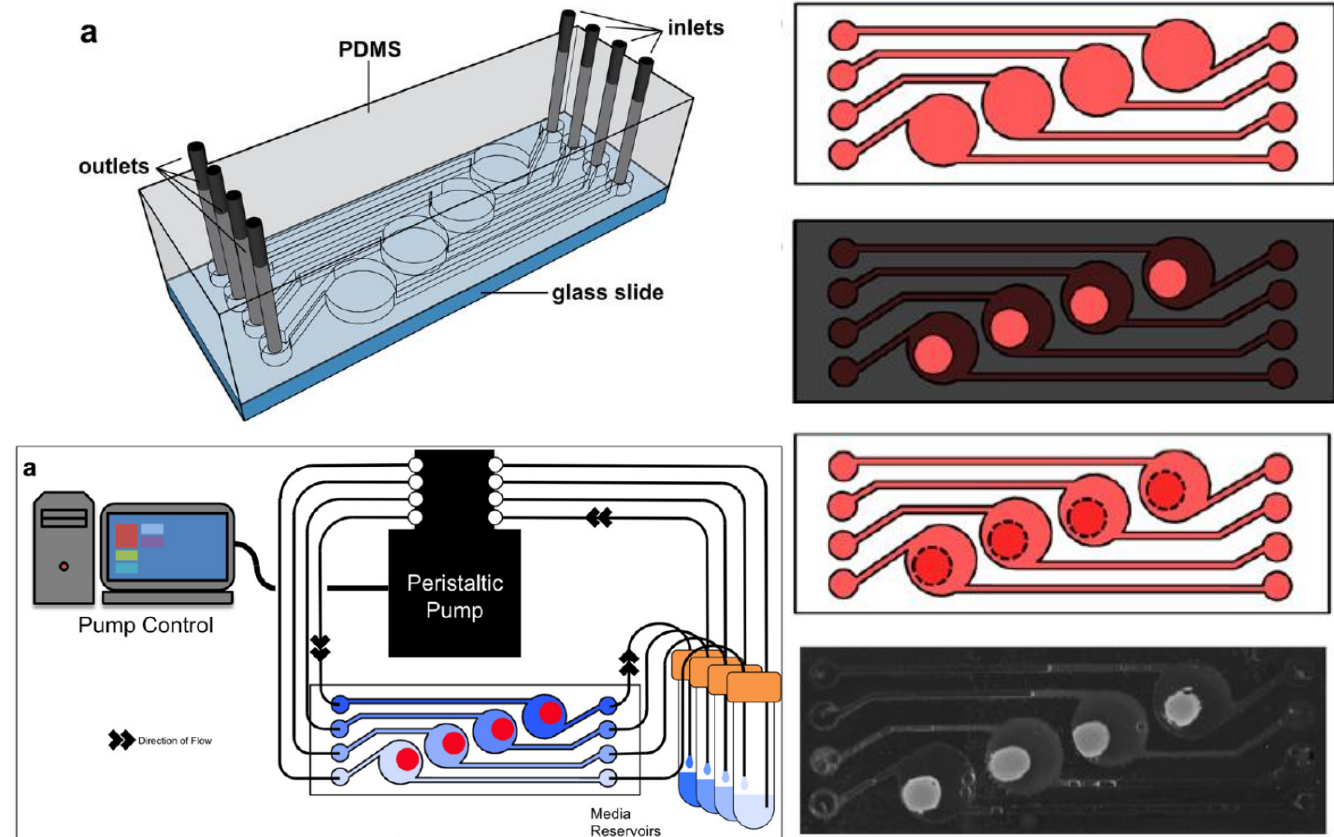
Fegato



In situ patterned micro 3D liver constructs for parallel toxicology testing in a fluidic device

Aleksander Skardal, Mahesh Devarasetty, Shay Soker and Adam R. Hall

- Tecnica di bioprinting: stereolitografia con proiezione a maschera “*in situ*”
- Bioink: gelatina metacrilata con cellule epatiche
- Tipologia di costrutto: costrutti circolari all’interno di un sistema di fluidodinamica con camere parallele.
- Tipo di studio: test *in vitro*

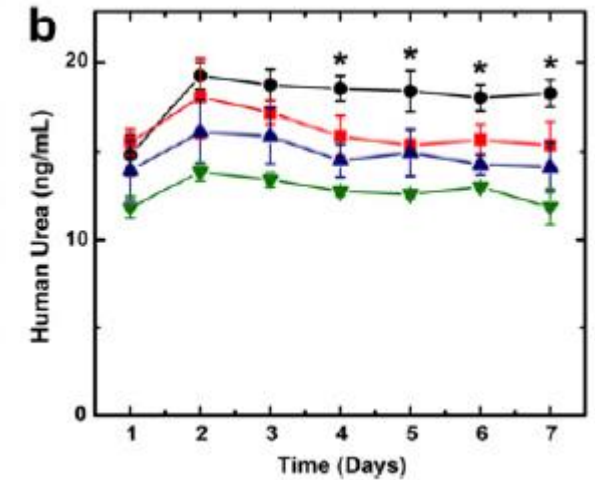
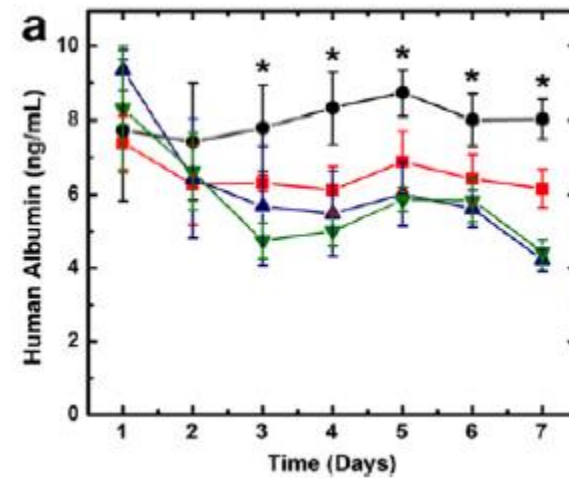
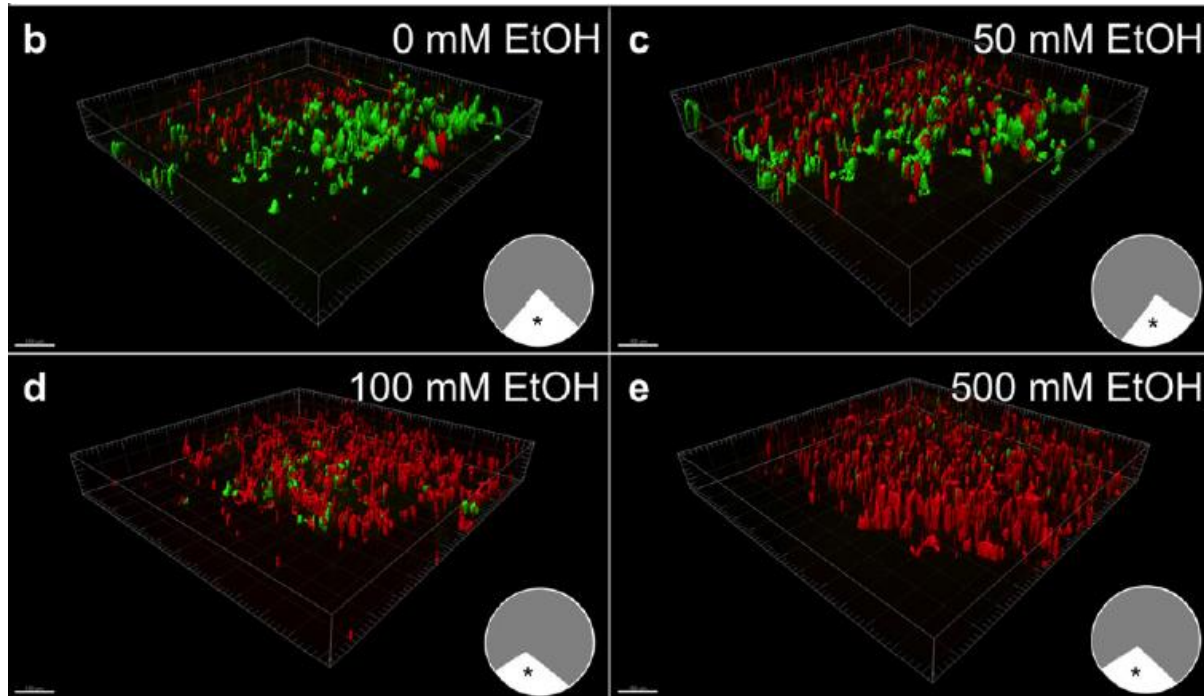


Fegato

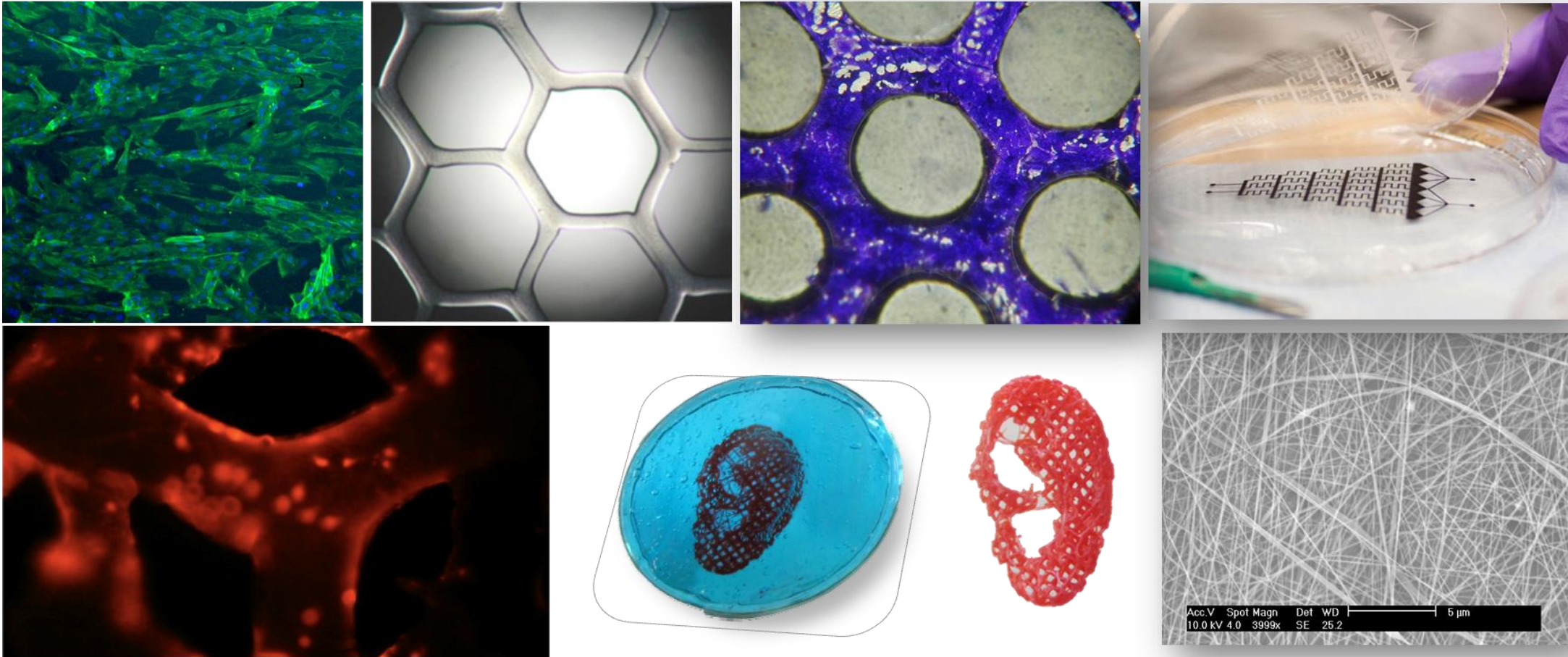
- + *In situ* patterned micro 3D liver constructs for parallel toxicology testing in a fluidic device

Aleksander Skardal, Mahesh Devarasetty, Shay Soker and Adam R. Hall

1. Vitalità dei costrutti sotto mezzo ricircolante per 7 giorni.
2. Un proof of concept dell'utilizzo della piattaforma per screening tossicologico



0 mM (black circles), 50 mM (red squares), 100 mM (blue upward triangles), and 500 mM (green downward triangles) ethanol

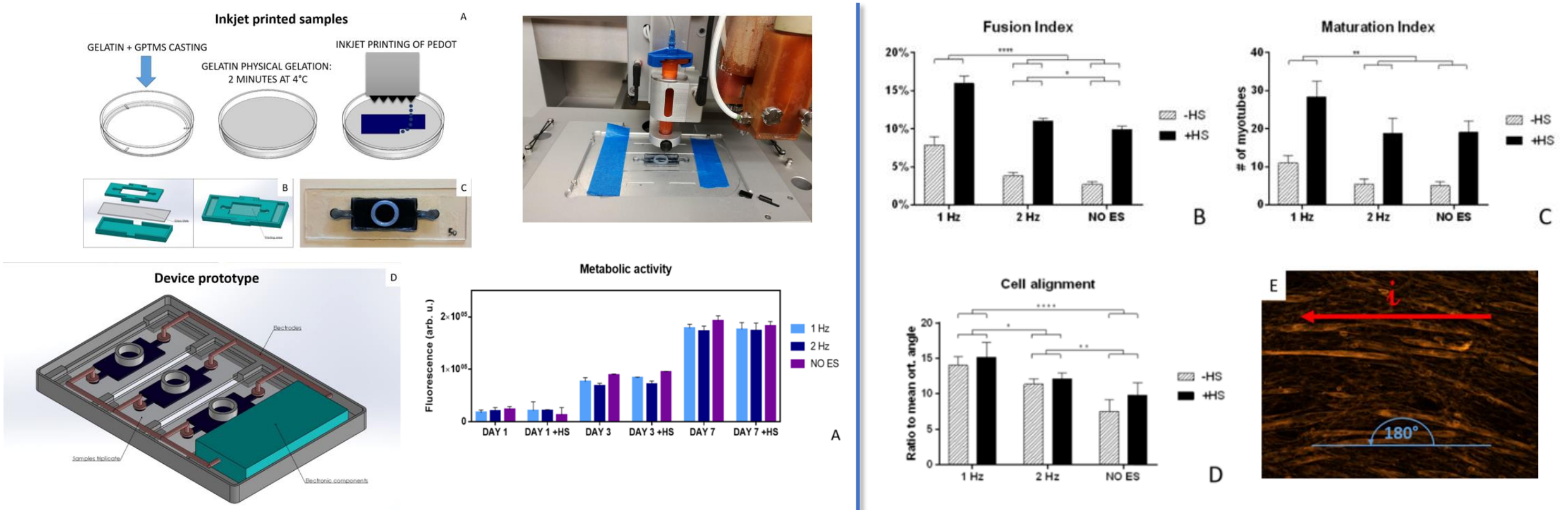


Biofabbricazione @ Centro di Ricerca Enrico Piaggio

+ Piattaforma di stimolazione elettrica per la rigenerazione del tessuto muscolare

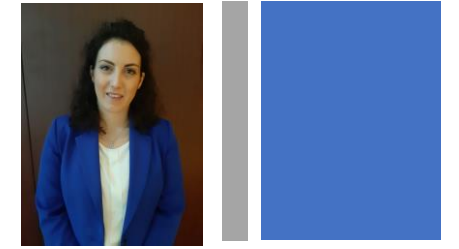


Stampa inkjet di materiale conduttivo (PETOD) su substrato di gelatina per la creazione di una piattaforma per la rigenerazione del tessuto muscolare

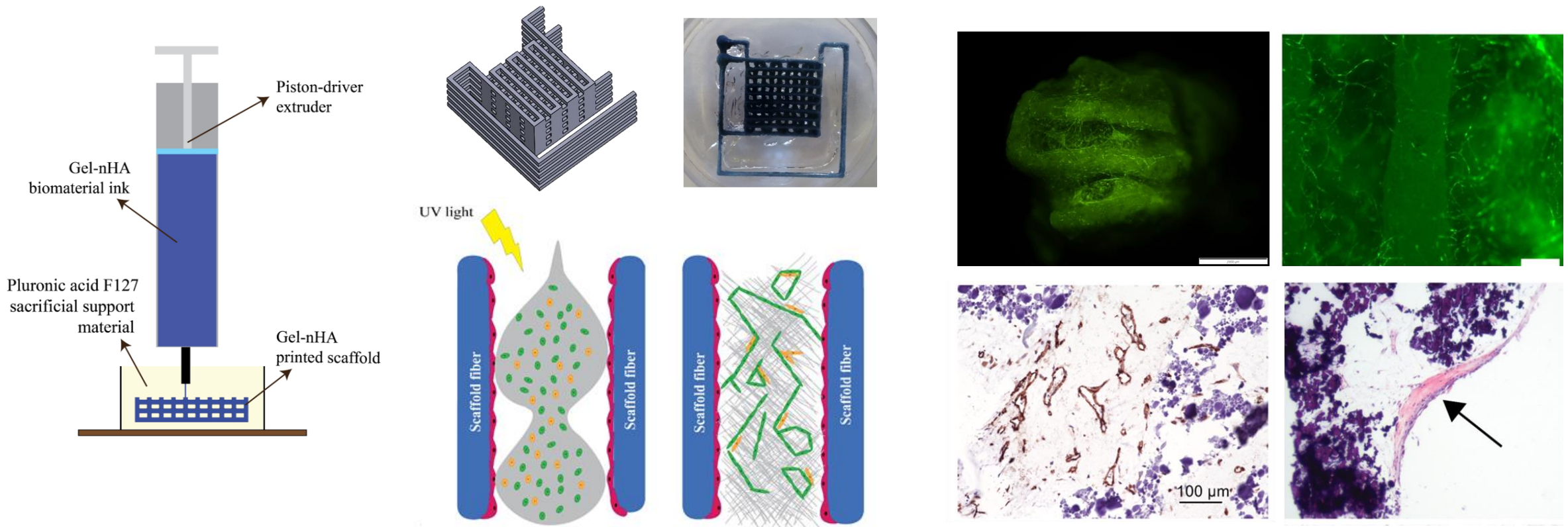


- Fortunato, Gabriele Maria, et al. "An ink-jet printed electrical stimulation platform for muscle tissue regeneration." *Bioprinting* 11 (2018): e00035.

+ Modelli *in vitro* di osso vascolarizzato



Stampa 3D ad estrusione per la fabbricazione di scaffold ossei per lo sviluppo di modelli *in vitro* di osso vascolarizzato

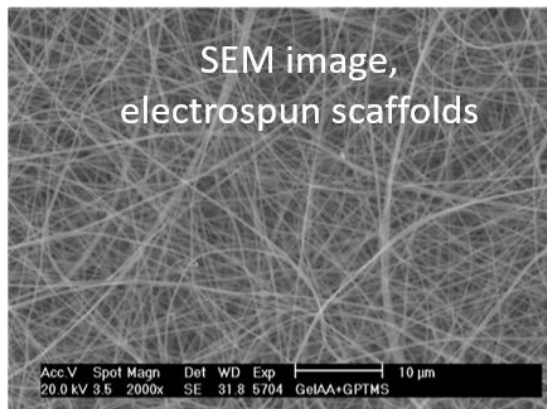


- Chiesa, I. De Maria, C. Lapomarda, A, Fortunato G. M., Montemurro, F. et al. (2020). Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6a1d>

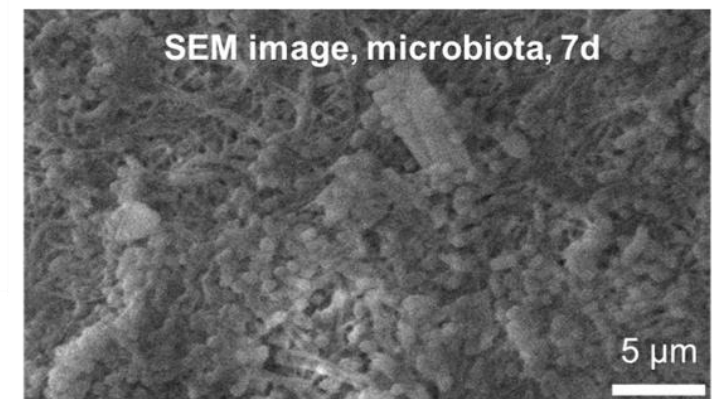
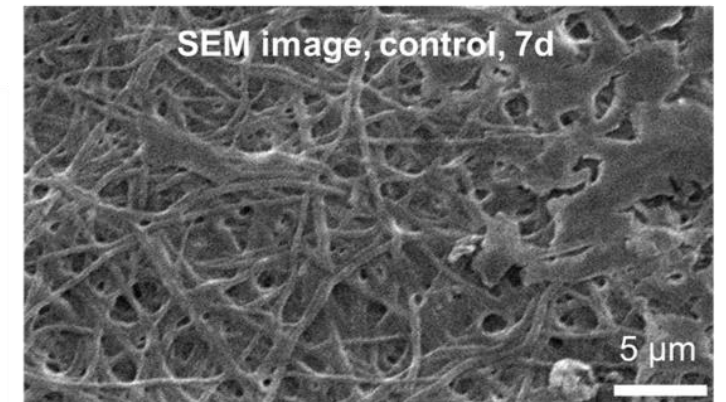
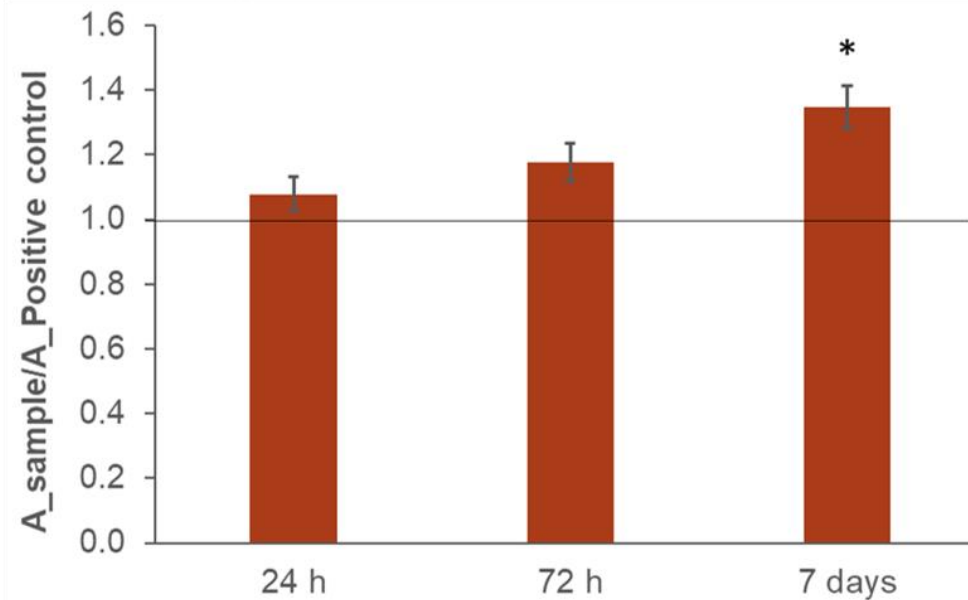
+ Scaffold elettrospinnati per lo studio *in vitro* del microbiota intestinale



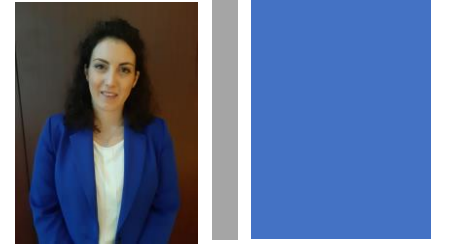
Microbiota intestinale umano coltivato su **scaffold elettrospinnati** in gelatina per studiarne la **composizione** e utilizzabile come modulo per lo **sviluppo di modelli *in vitro* multiorgano complessi**



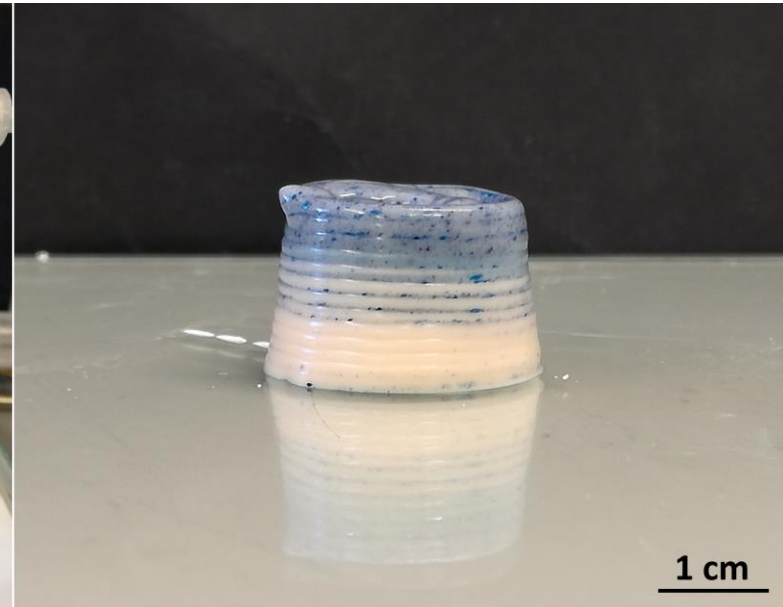
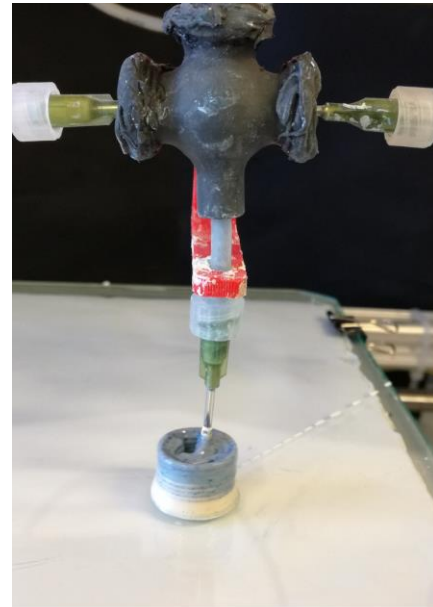
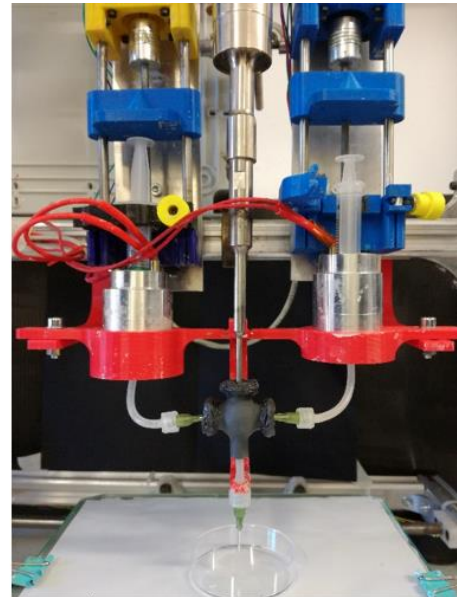
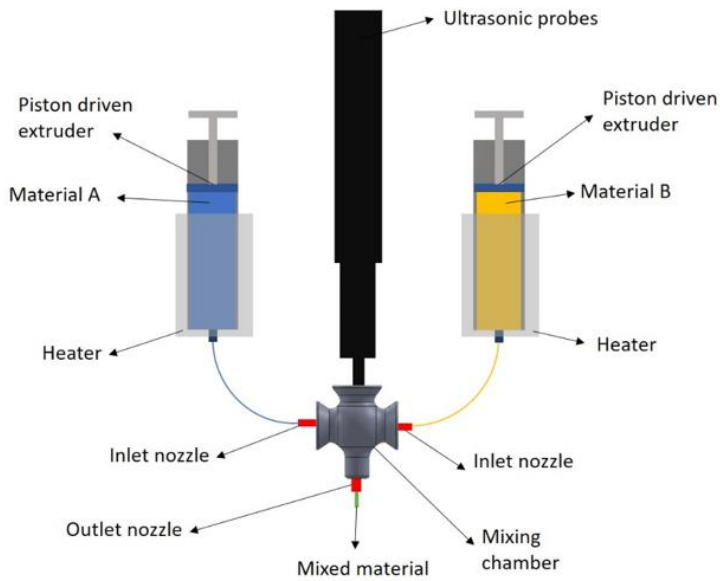
Human gut microbiota biofilm formation



+ Stampa 3D ad estrusione di strutture graduate



Sviluppo di un **sistema di mixing** per lo sviluppo di **scaffold funzionalmente graduati**

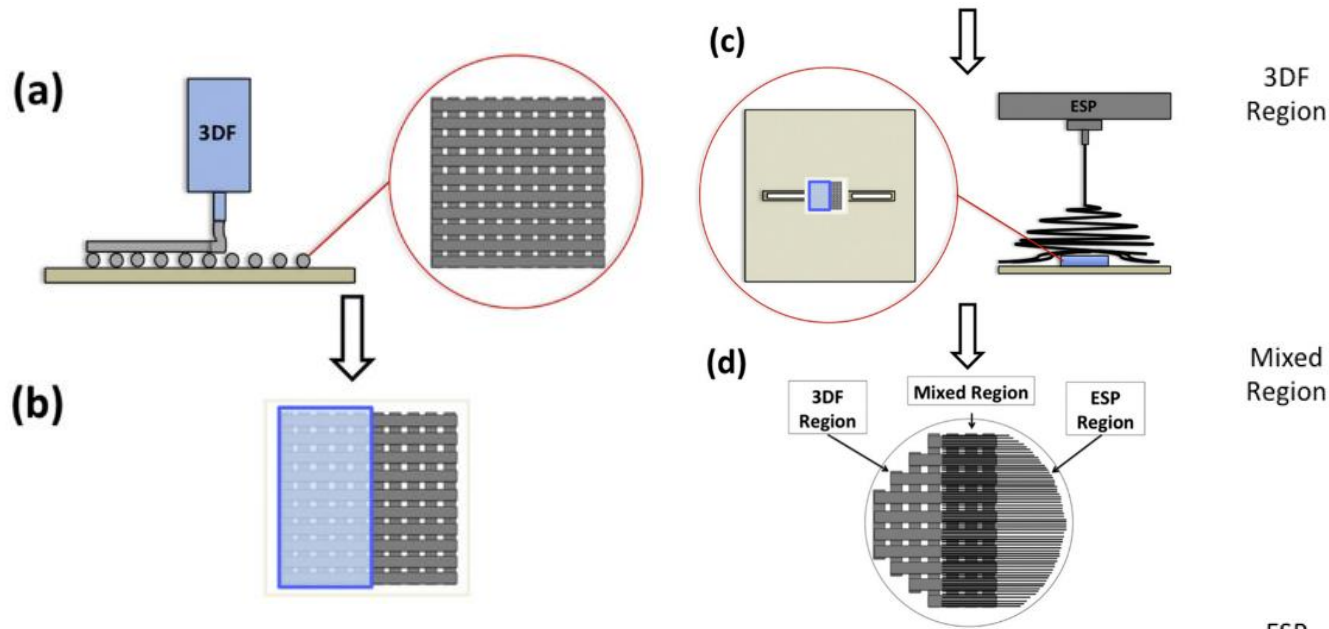


- Chiesa, I., Fortunato, G. M., Lapomarda, A., Di Pietro, L., Biagini, F., De Acutis, A., ... & Vozzi, G. (2019). Ultrasonic mixing chamber as an effective tool for the biofabrication of fully graded scaffolds for interface tissue engineering. *The International journal of artificial organs*, 0391398819852960.

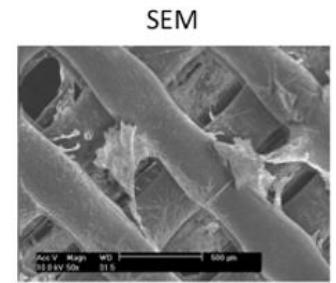
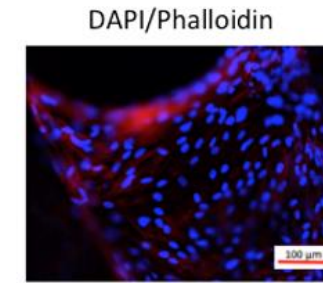
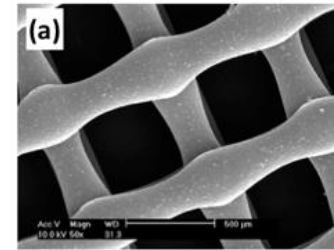
+Scaffold trifasici per la rigenerazione del legamento



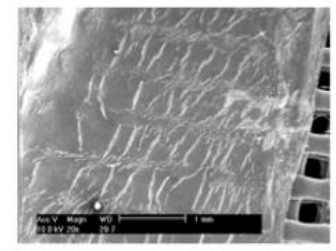
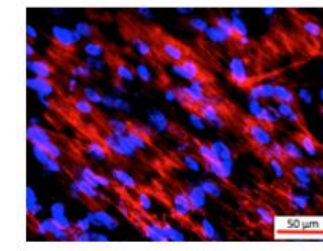
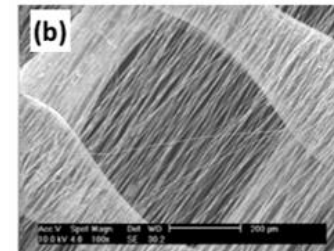
Combinazione di stampa 3D ad estrusione ed electrospinning per la fabbricazione di scaffold funzionalmente graduate per la rigenerazione dell'interfaccia osso-legamento



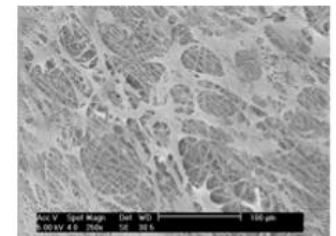
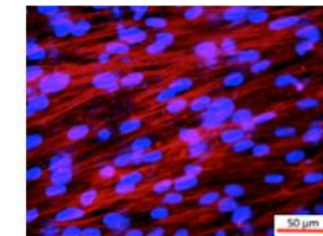
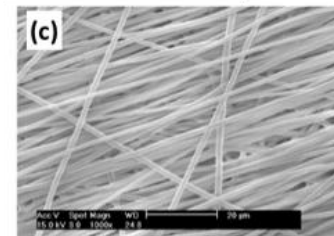
3DF Region



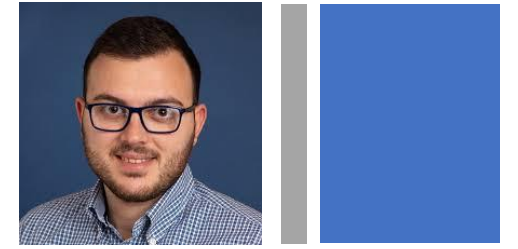
Mixed Region



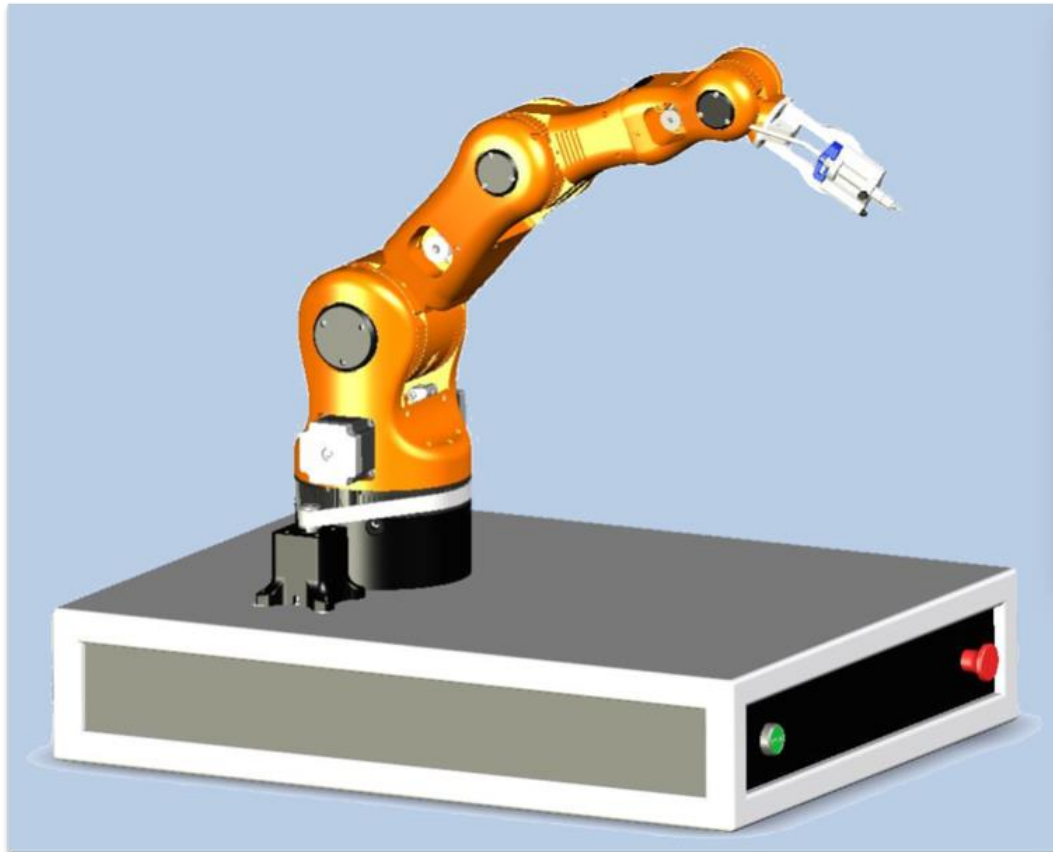
ESP Region



+ Stampante 3D basata su un braccio robotico collaborativo per in situ bioprinting



L'analisi di un **piattaforma di stampa 3D** multiscale basata su un **braccio robotico collaborativo** in grado di **assistere il chirurgo** durante le fase operatoria, in grado di **fabbricare strutture 3D** strato per strato su **superfici irregolari** e con **proprietà meccaniche diverse**.



Farnesina
Ministero degli Affari Esteri
e della Cooperazione Internazionale



Centro E. Piaggio
bioengineering and robotics research center

Thanks for your attention!

Questions?

Irene Chiesa

irene.chiesa@phd.unipi.it

**Biofabrication group
University of Pisa**

- Prof. Giovanni Vozzi, Ph.D
- Carmelo De Maria, Ph.D
- Aurora De Acutis, Ph.D
- Gabriele Maria Fortunato, M.Sc
- Amedeo Franco Bonati, M.Sc
- Francesca Montemurro, Ph.D
- Anna Lapomarda, M.Sc
- Francesco Biagini, M.Sc
- Irene Chiesa, M.Sc



@BioFabUNIPi



www.centropiaggio.unipi.it/research/biofabrication.html

