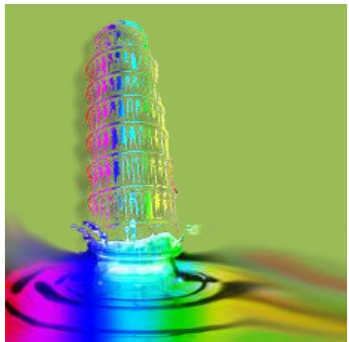
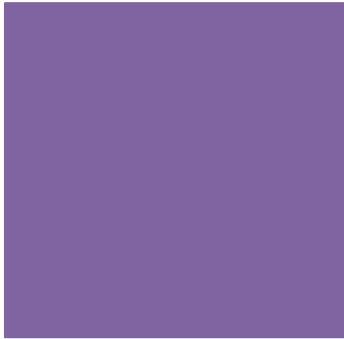




Centro E. Piaggio
bioengineering and robotics research center

Stampa 3D e biofabbricazione in ambito biomedicale



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

irene.chiesa@phd.unipi.it

+ Outline

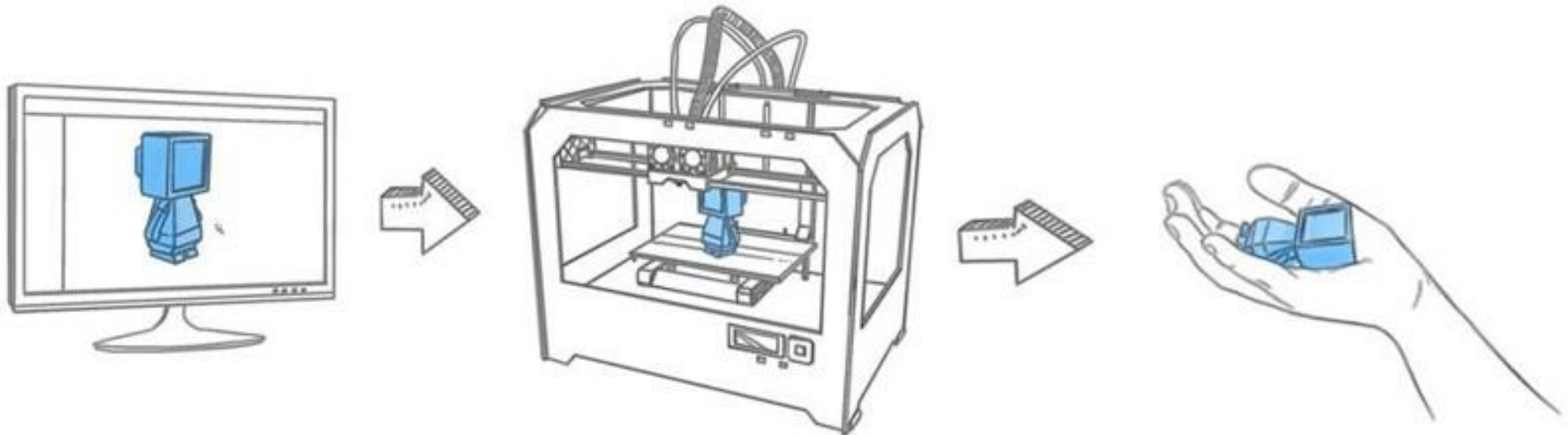
- Introduzione alla stampa 3D
- Pipeline di stampa: Definizione del modello 3D
- Modelli 3D da immagini biomedicali
- Introduzione al CAD
- Descrizione delle varie tecniche di fabbricazione
- Stampa 4D
- Slicing con cura
- Introduzione **all'ingegneria dei tessuti**
- Definizione di **biofabbricazione,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



+ Stampa 3D

La stampa 3D (fabbricazione additiva) è un processo di fabbricazione di un **oggetto solido 3D** a partire **da un modello digitale** dell'oggetto stesso.

Si ottiene attraverso un **processo additivo**, dove successivi strati di materiale sono depositati l'uno sull'altro fino ad ottenere la forma finale



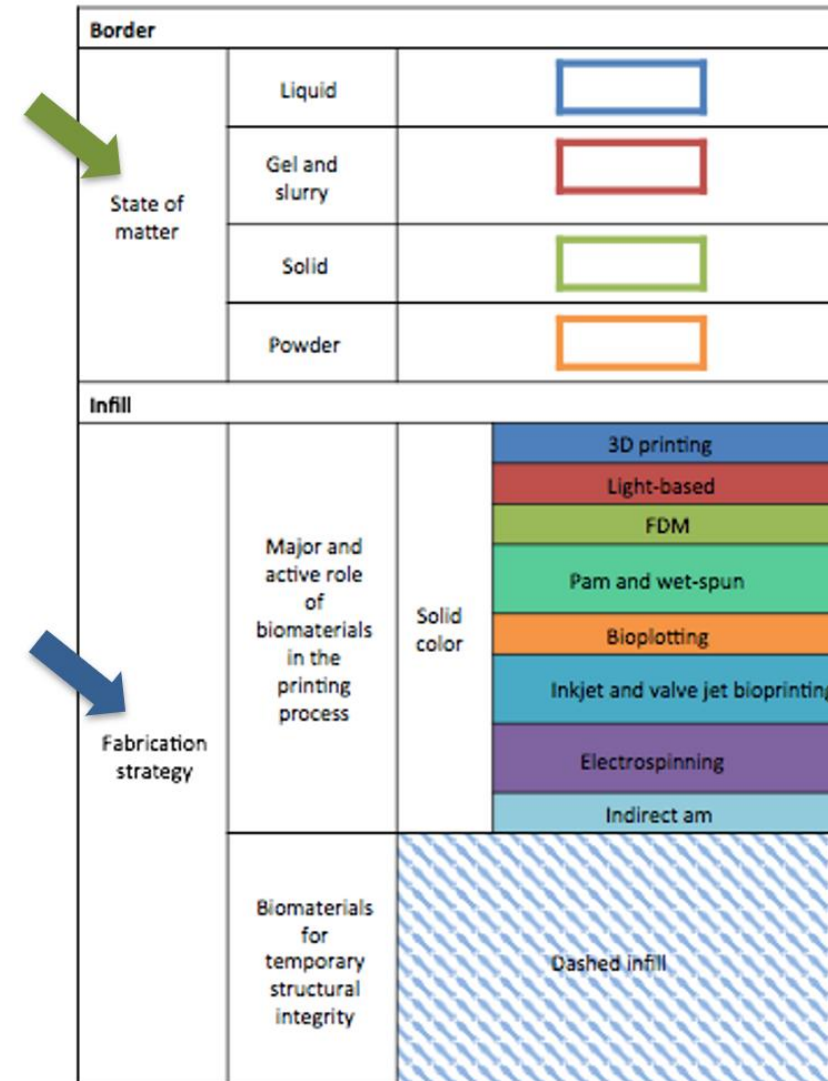


+ Vantaggi stampa 3D

- Complessità funzionale e geometrica
- Possibilità di fabbricare parti multi-materiale in un unico processo
- Velocità nel cambiare il design dell'oggetto
- Elevata personalizzazione
- ...

+ Tecnologie di stampa 3D

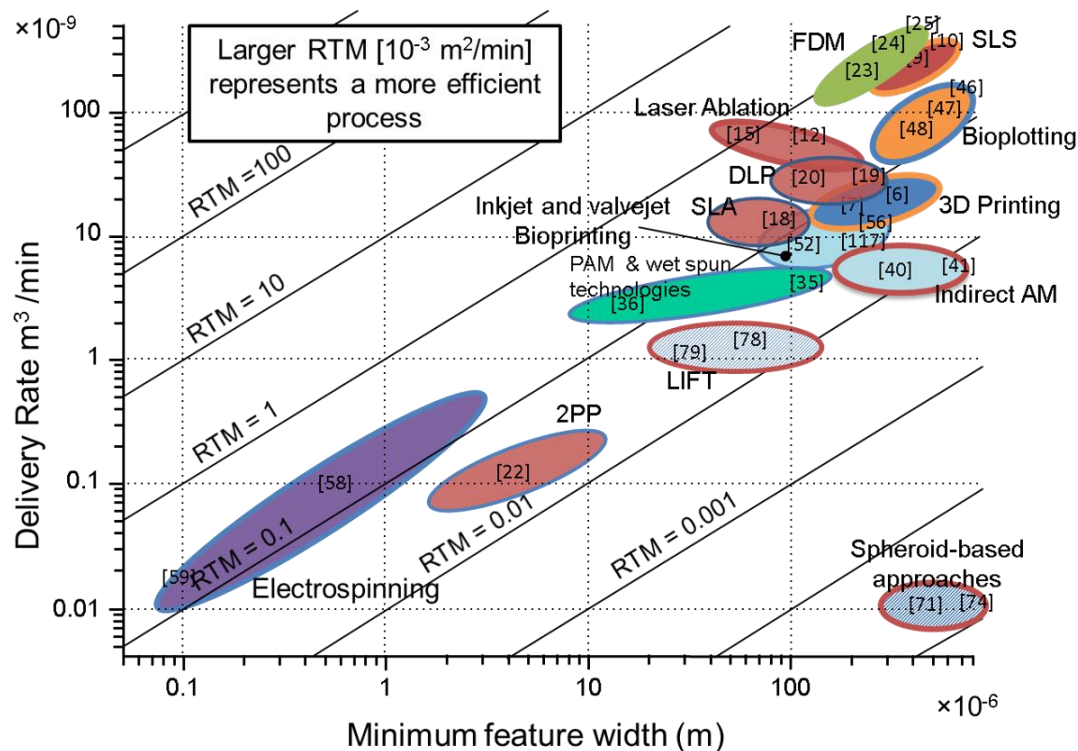
- Fused deposition modelling
- Tecnologie light-based
 - Stereolitografia
 - Fotopolimerizzazione a due fotoni
 - Liquid Induced Transfer Forward
 - Laser sintering
- Tecnologie inkjet
 - Inkjet 2D
 - Tecnologia Polyket
 - Tecnologia Binder Jetting (3D printing™)
- Stampa 3D ad estrusione
- Electrospinning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



+ Classificazione delle tecniche di stampa 3D



Il rapporto tra la **risoluzione spaziale** e il **tempo di fabbricazione** permette di **caratterizzare quantitativamente** le varie tecniche di stampa, considerando la capacità di fabbricare strutture con dettagli fini in un intervalli di tempo fine come una misura di merito. Questo rapporto permette quindi di **classificare** le tecniche di stampa 3D in base all'**efficacia di fabbricazione**.



$$RTM = \frac{\text{Risoluzione Spaziale}}{\text{Tempo di fabbricazione}} \cong R * P = \frac{1}{d} * \frac{V}{t}$$

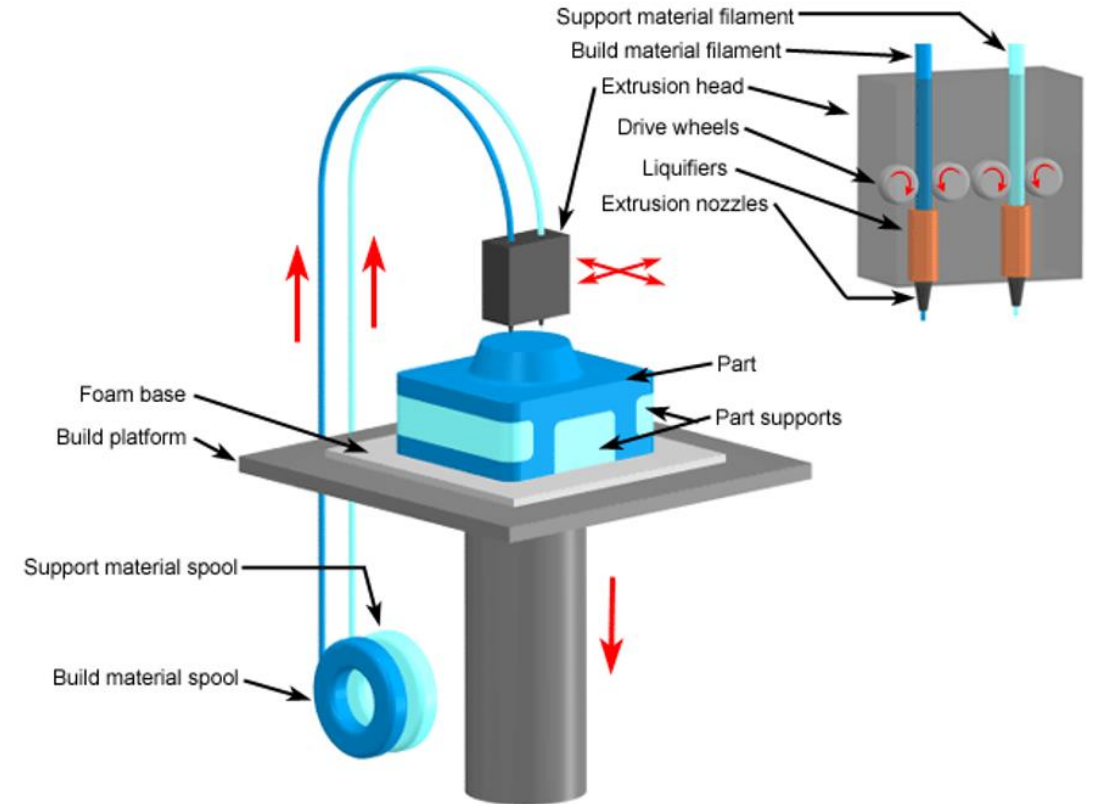
- R = **risoluzione spaziale**, intesa come l'inverso della dimensione (d) della minima caratteristica fabbricabile
- P = **delivery rate**, inteso come la quantità di volume (V) depositata nell'unità di tempo

+ Fused deposition modelling (FDM)



+ Fused deposition modelling (FDM)

- Il materiale di stampa si trova allo **stato solido filiforme** e avvolto in bobine.
- Durante il processo di stampa viene **riscaldato** fino alla **temperatura di rammollimento** e viene depositato sul piano di stampa strato per strato. Appena tocca il piatto di stampa il materiale si solidifica mantenendo la forma
- Diametro filamento = 3 mm o 1.75 mm;
Diametro nozzle = 0.5 mm o 0.35 mm



- Woodfield, Tim BF, et al. "Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique." *Biomaterials* 25.18 (2004): 4149-4161.
- Zein, Iwan, et al. "Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications." *Biomaterials* 23.4 (2002): 1169-1185.

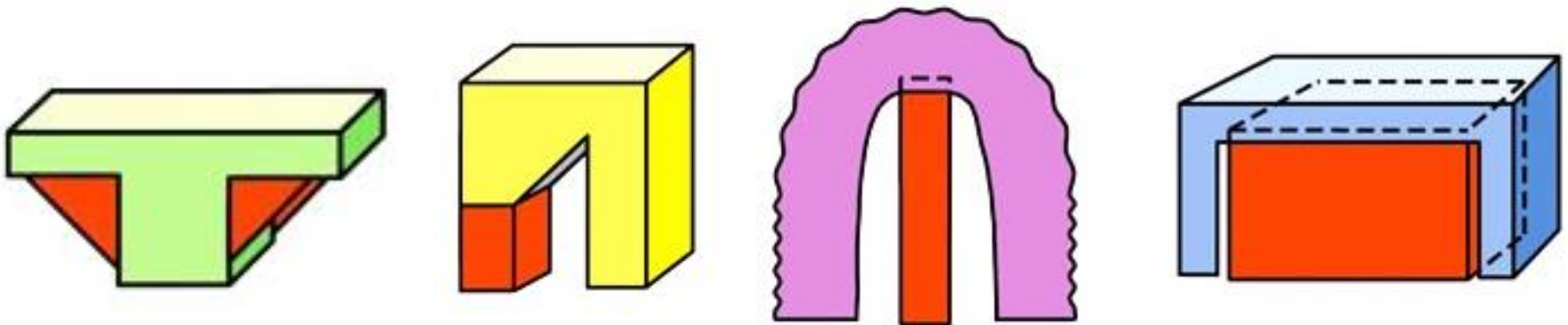
+ Fused deposition modelling (FDM)

- Materiali: **PLA**, ABS, **PCL**, polimeri conduttivi (TPU)
- Molte stampanti 3D FDM sono dotate di **due o più estrusori**:
 - Ottenere strutture multi-materiale



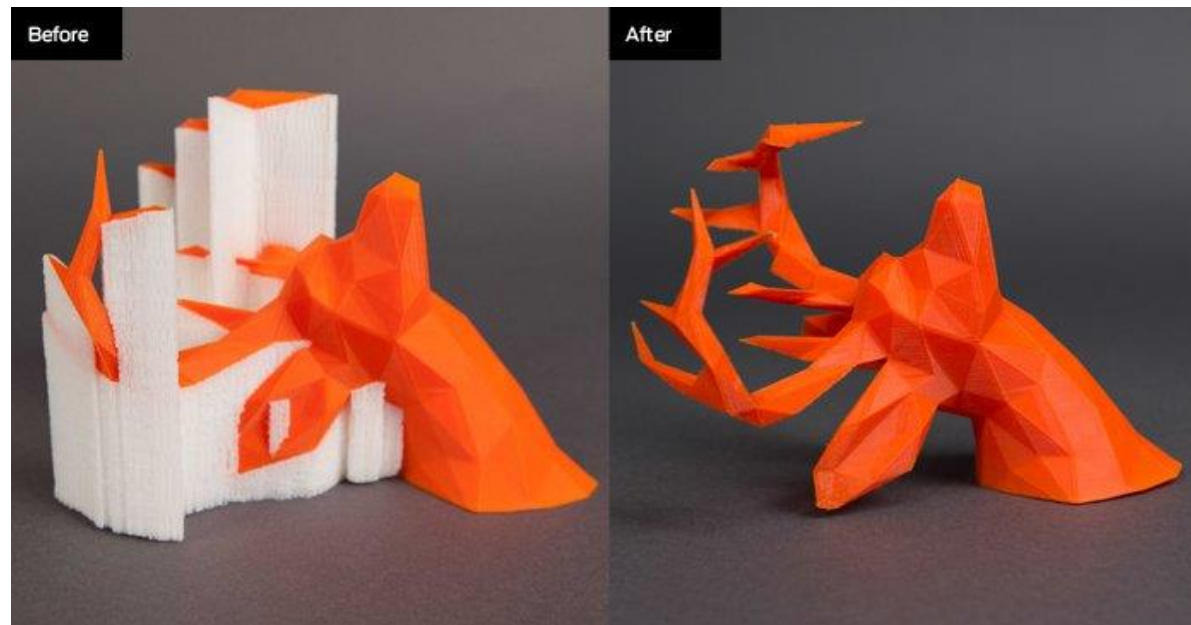
+ Fused deposition modelling (FDM)

- Materiali: **PLA**, ABS, **PCL**, polimeri conduttivi (TPU)
- Molte stampanti 3D FDM sono dotate di **due estrusori**:
 - Ottenere strutture bi-materiale
 - Poter stampare strutture con parti a sbalzo → uno dei materiali fa da supporto



+ Fused deposition modelling (FDM)

- Materiali: **PLA**, ABS, **PCL**, polimeri conduttivi (TPU)
- Molte stampanti 3D FDM sono dotate di **due estrusori**:
 - Ottenere strutture bi-materiale
 - Poter stampare strutture con parti a sbalzo → uno dei materiali fa da supporto



+ FDM: progetto RepRap

- Tra il 2009 e il 2010 sono scaduti i brevetti riguardanti le prime stampanti 3D e nacque il **progetto RepRap** (Replicating Rapid Prototyping)
- Iniziativa finalizzata a **sviluppare stampanti 3D a basso costo in grado di fabbricare pezzi necessari ad assemblare nuove stampanti 3D**
- Tutti i lavori creati in questo ambito sono pubblicati con licenza open, facilmente accessibili
- Ciò ha permesso **l'abbassamento dei costi** e la **massificazione** della stampa 3D

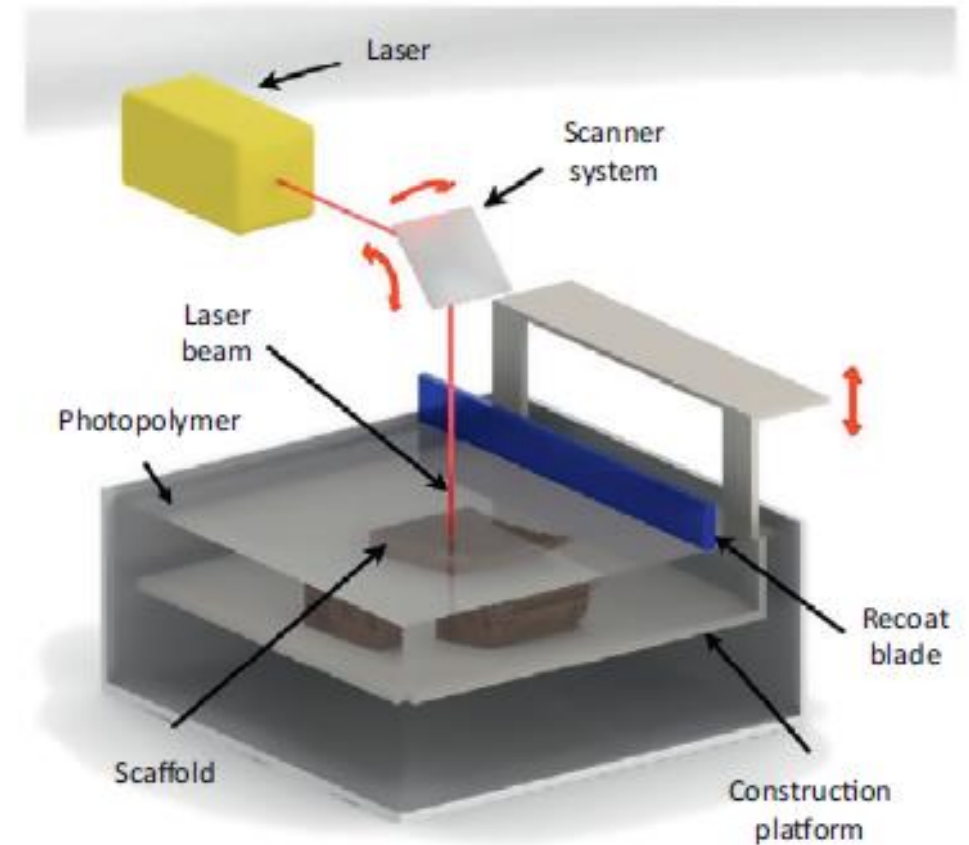


+ Stereolitografia (SLA)



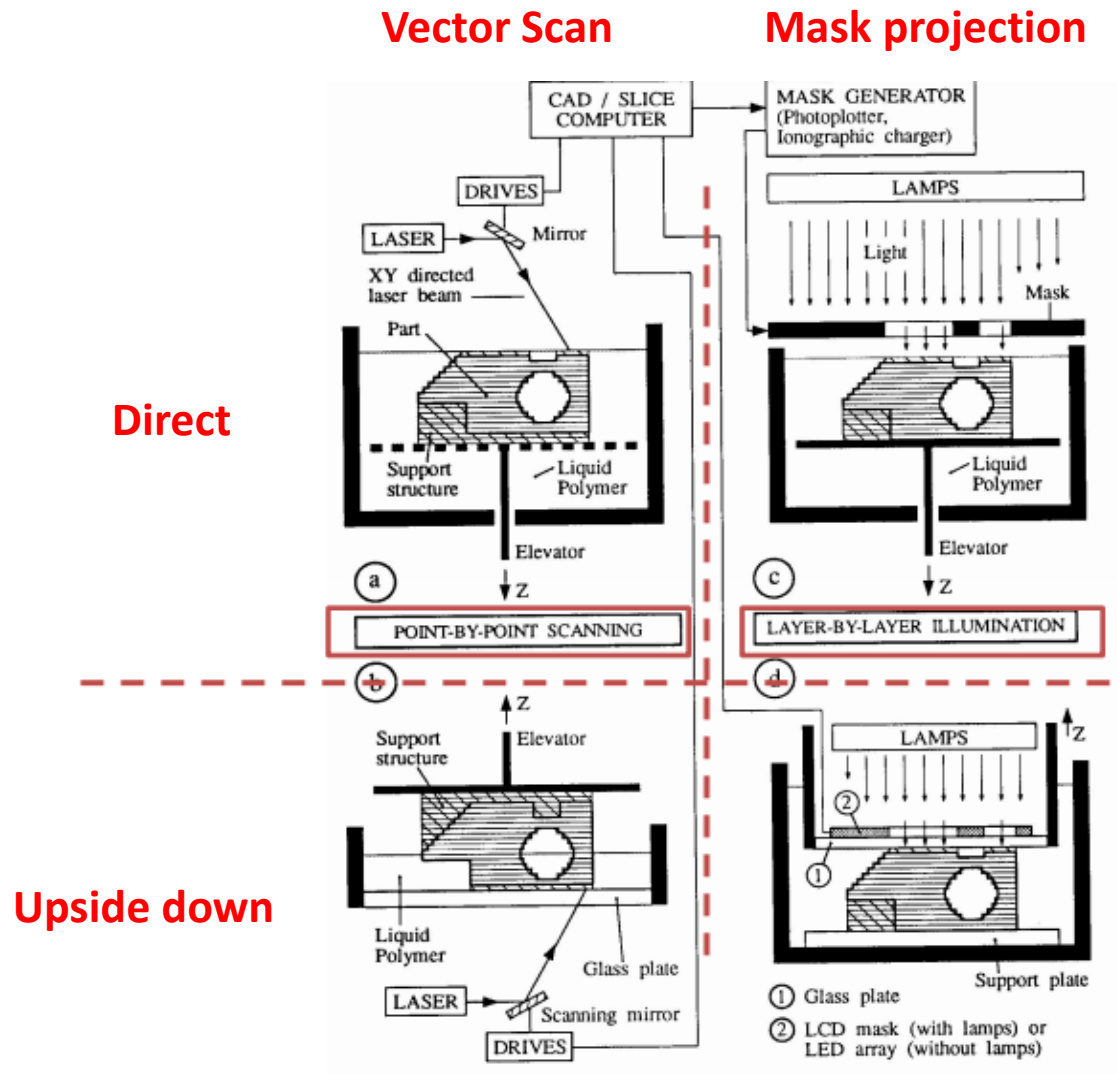
+ Stereolitografia (SLA)

- Il materiale di stampa è una **resina fotosensibile** che inizialmente si trova allo **stato liquido**
- Un **laser UV** viene utilizzato per **fotopolimerizzare** il materiale in **punti specifici**, strato per strato formando l'oggetto tridimensionale
- Sistema molto preciso che permette di ottenere strutture con risoluzione 25-100 μm



- Gauvin, Robert, et al. "Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography." *Biomaterials* 33.15 (2012): 3824-3834.
- Cooke, Malcolm N., et al. "Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 64.2 (2003): 65-69

+ Stereolitografia (SLA)

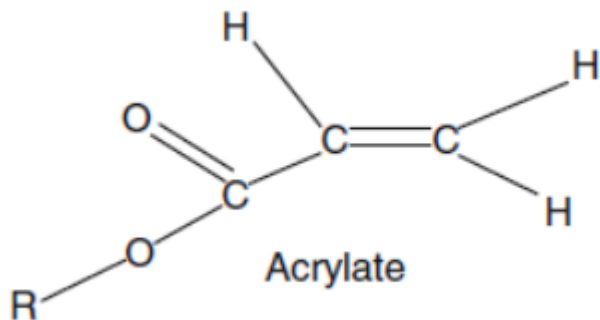


+ Stereolitografia (SLA)

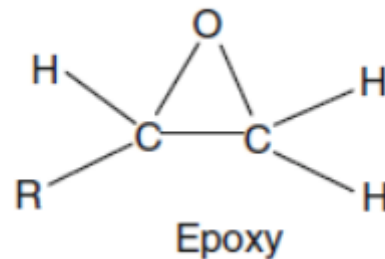


Fotopolimeri = polimeri termoindurenti che se **esposti** ad una **certa lunghezza d'onda polimerizzano**

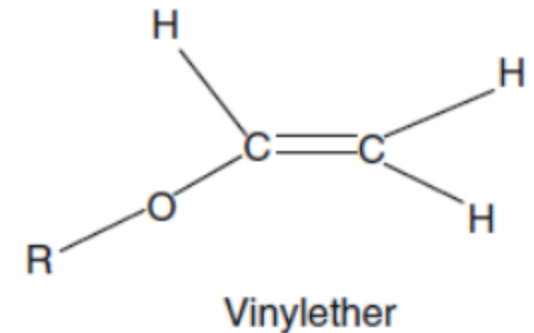
- Acrilati



- Resine epossidiche

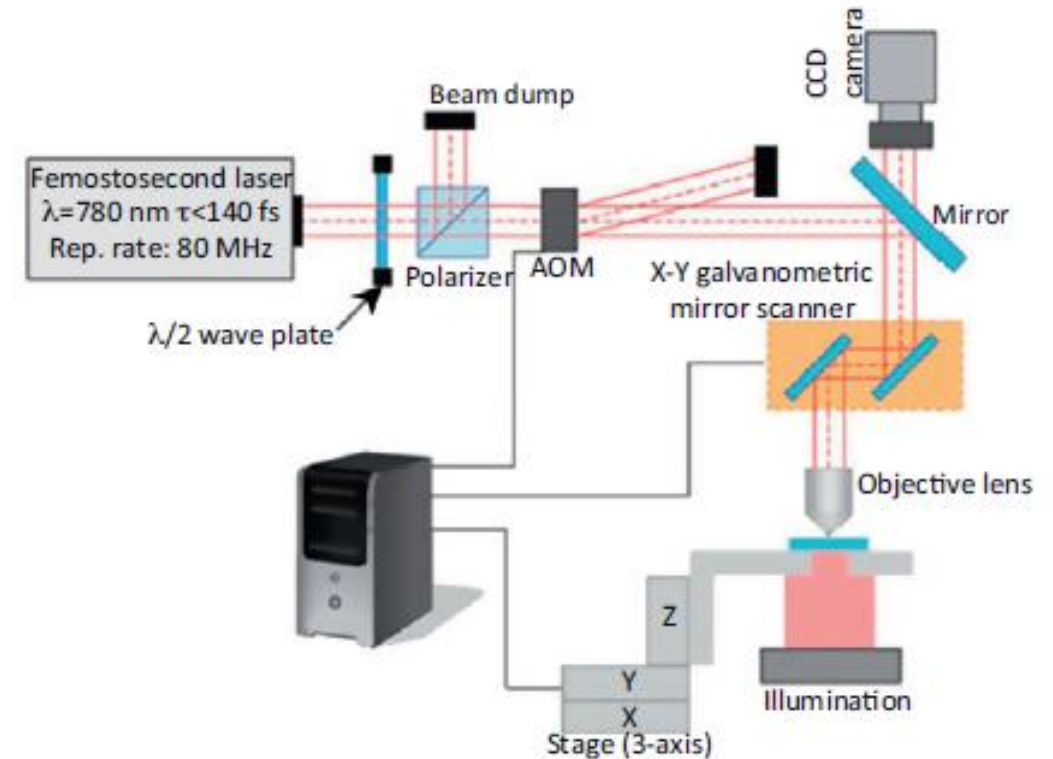


- Vinil eteri



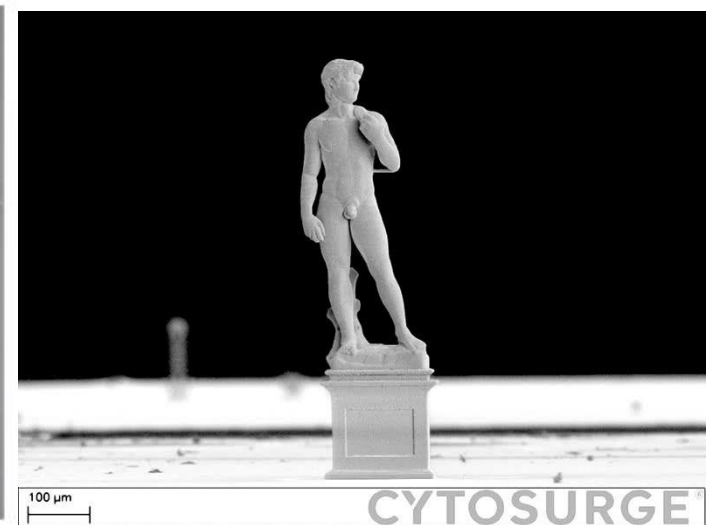
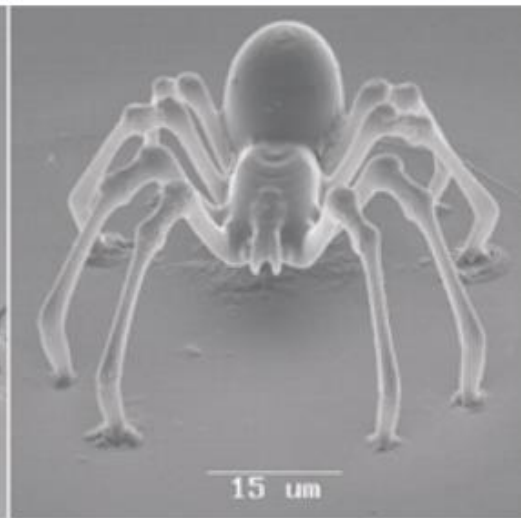
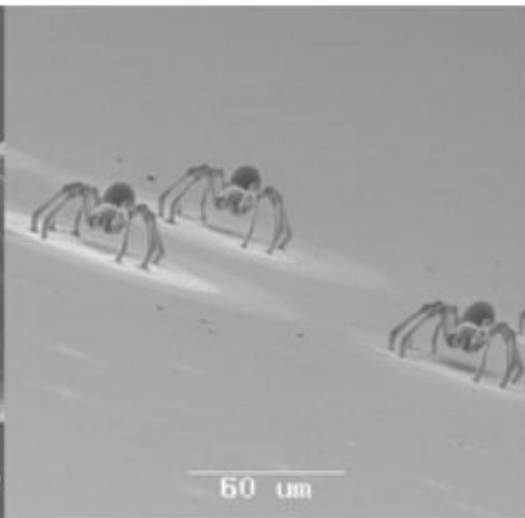
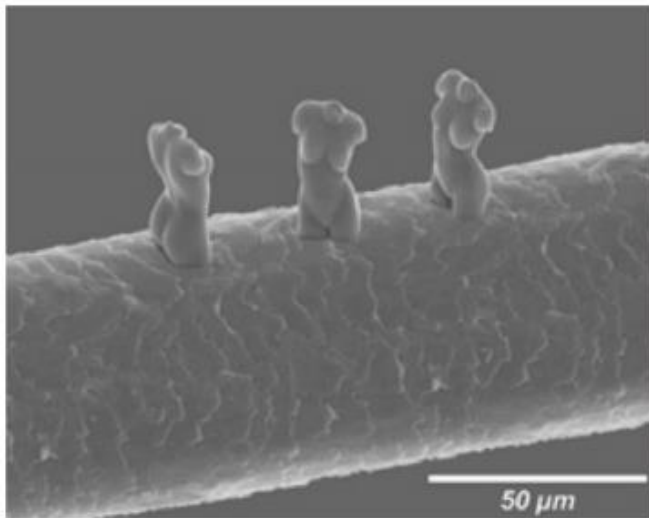
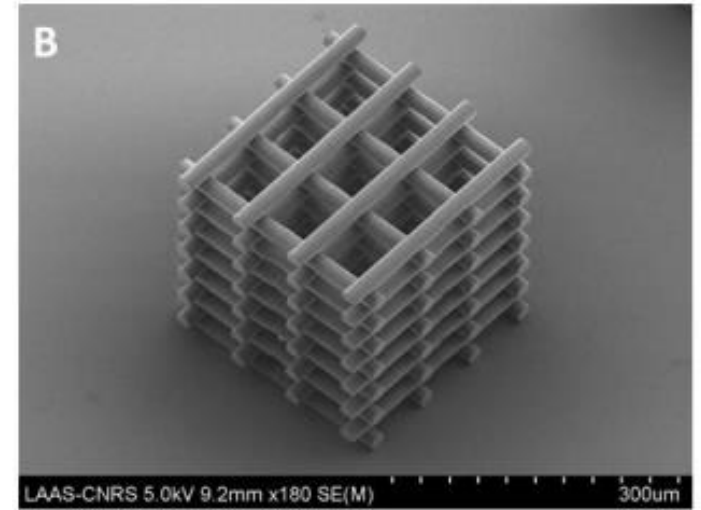
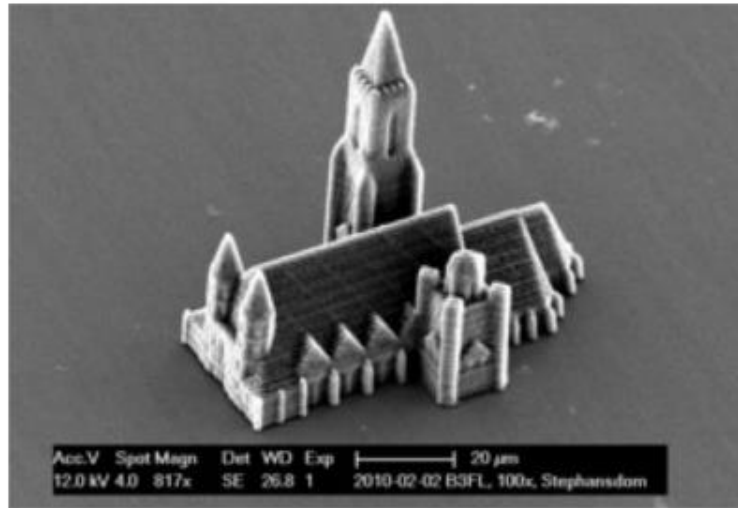
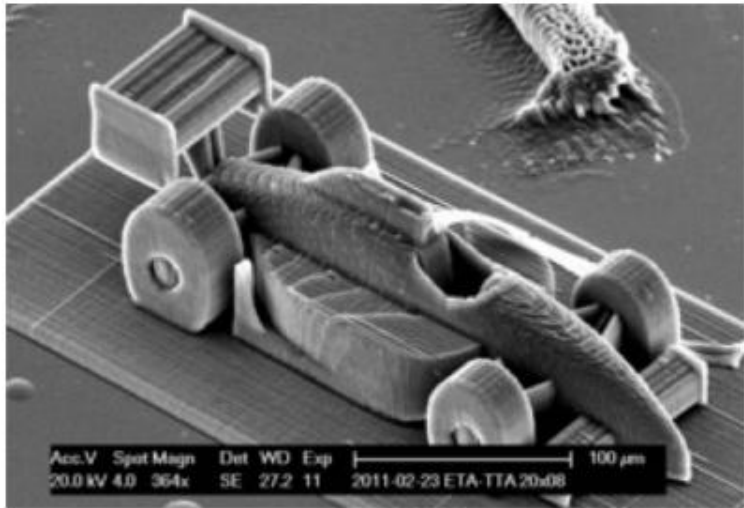
+ Polimerizzazione a due fotoni

- É una tecnica di stampa 3D laser-based che si basa sull'assorbimento a due fotoni per ottenere una polimerizzazione estremamente confinata nella regione di fuoco
- La polimerizzazione avviene solo se 2 fotoni colpiscono contemporaneamente il materiale
- Ciò permette di ottenere strutture nanometriche e micrometriche senza l'utilizzo di supporti



- Accardo, A., Blatché, M. C., Courson, R., Loubinoux, I., Thibault, C., Malaquin, L., & Vieu, C. (2017). Multiphoton direct laser writing and 3D imaging of polymeric freestanding architectures for cell colonization. *Small*, 13(27), 1700621.
- Ovsianikov, Aleksandr, et al. "Two-photon polymerization technique for microfabrication of CAD-designed 3D scaffolds from commercially available photosensitive materials." *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1.6 (2007): 443-449.

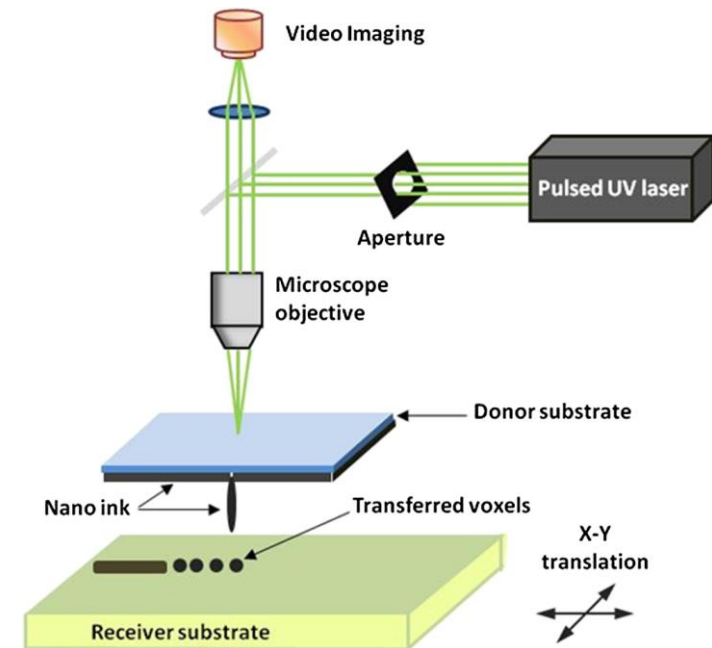
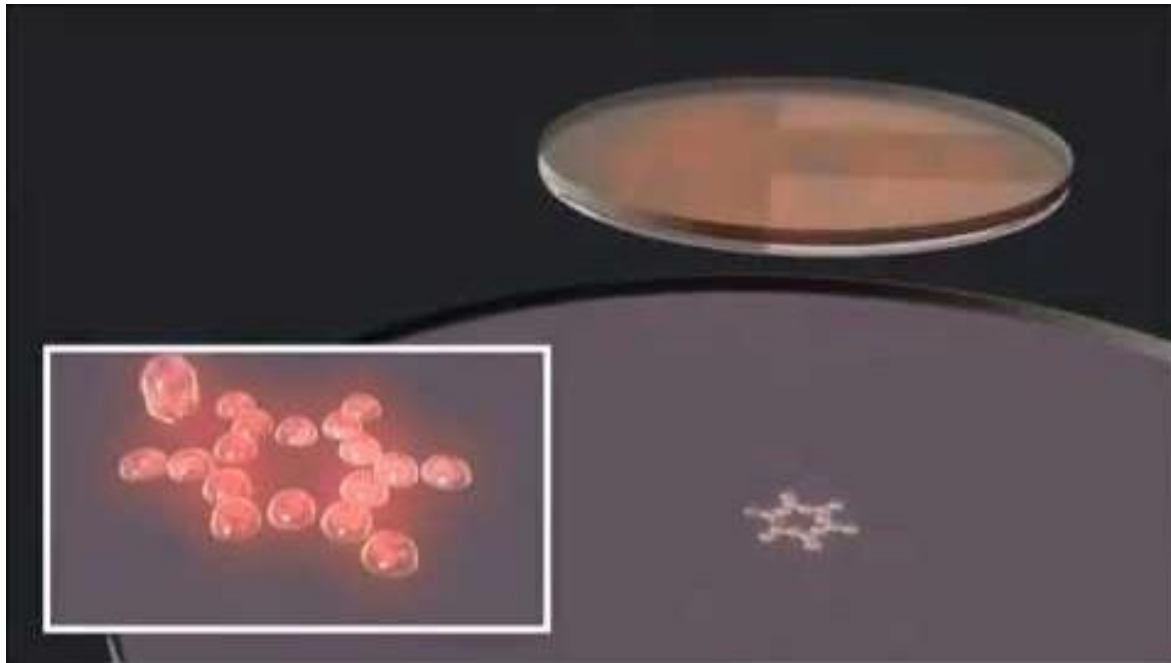
+ Polimerizzazione a due fotoni



+ Liquid Induced Transfer Forward (LIFT)

Sistemi di deposizione LIFT sono dotati di tre componenti

1. Una **sorgente laser** pulsatile
2. Un **target** bi-strato composto da uno **strato metallico** e da uno **strato di materiale biologico**
3. Un **substrato ricevente**



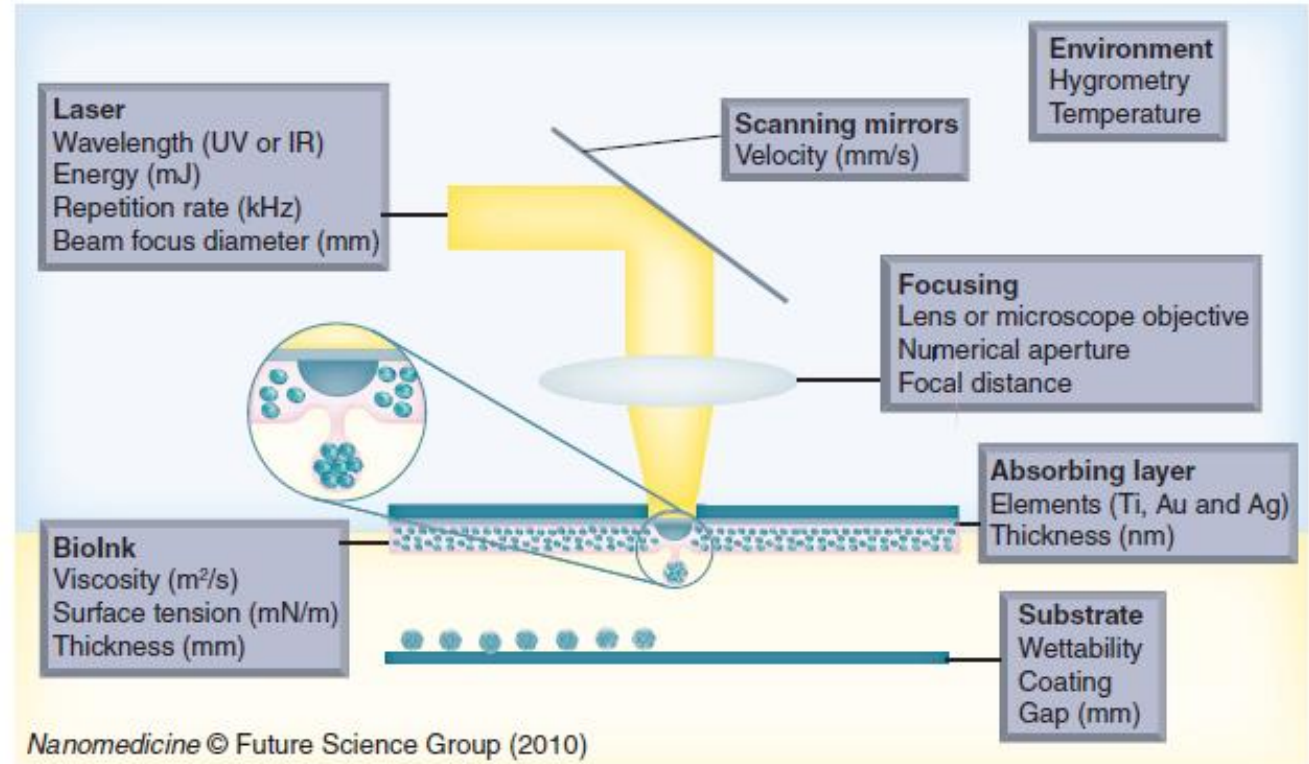
- Devillard, Raphaël, et al. "Cell patterning by laser-assisted bioprinting." *Methods in cell biology*. Vol. 119. Academic Press, 2014. 159-174.
- Barron, J. A., et al. "Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns." *Biomedical microdevices* 6.2 (2004): 139-147.

+ Liquid Induced Transfer Forward (LIFT)

La **risoluzione** della tecnica dipende da:

- Proprietà del laser
- Tensione superficiale del materiale
- Bagnabilità del substrato
- Dimensioni dello strato d'aria tra il ribbon e il substrato
- Spessore e viscosità dello strato

biologico

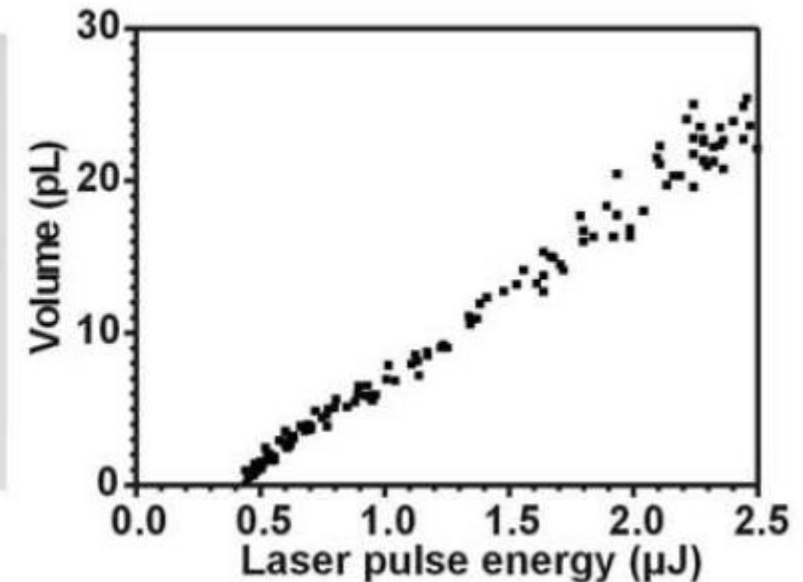
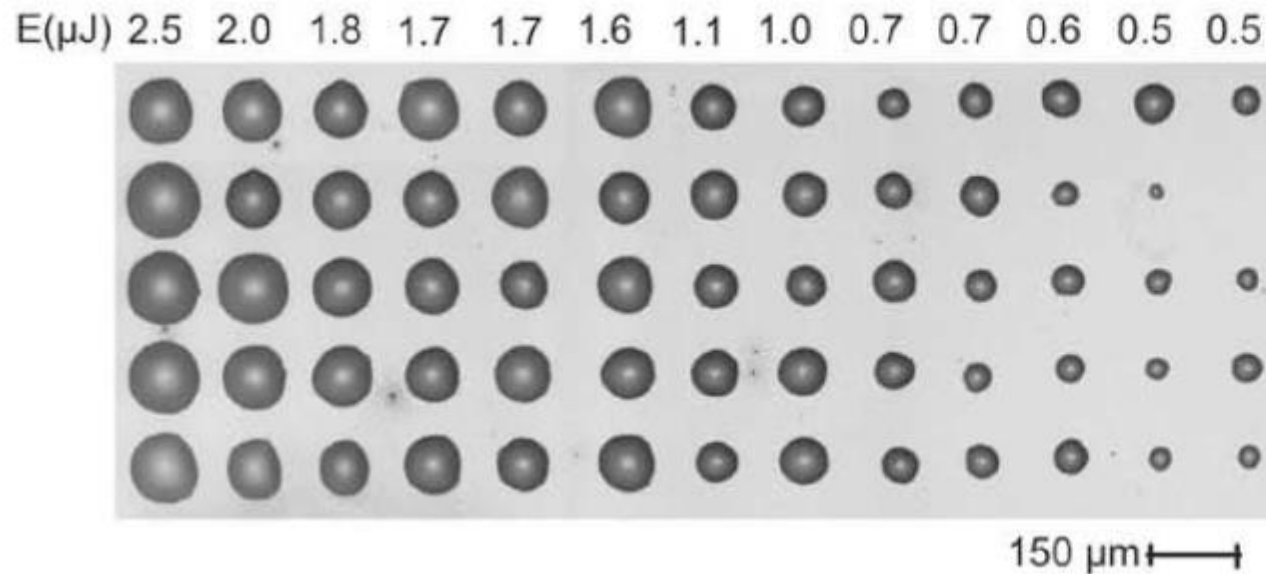
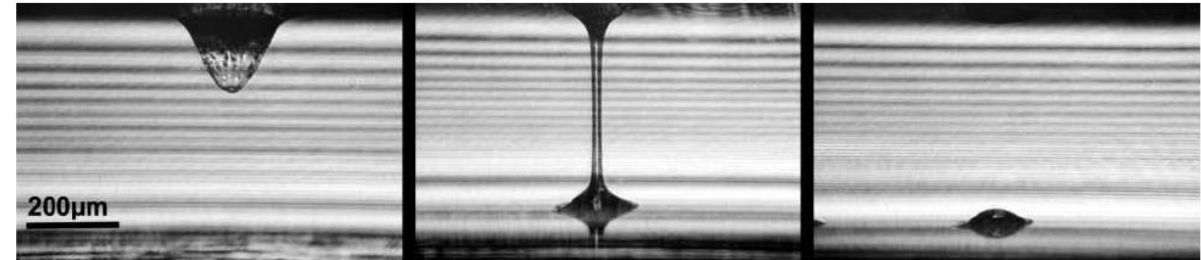


- Murphy, Sean V., and Anthony Atala. "3D bioprinting of tissues and organs." *Nature biotechnology* 32.8 (2014): 773-785.
- Guillemot, Fabien, et al. "Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering." *Nanomedicine* 5.3 (2010): 507-515.

+ Liquid Induced Transfer Forward (LIFT)



- Il **volume della goccia** è nell'ordine dei picolitri, con una frequenza di kHz
- Il **volume della goccia eiettata aumenta** linearmente con l'**energia del fascio laser**



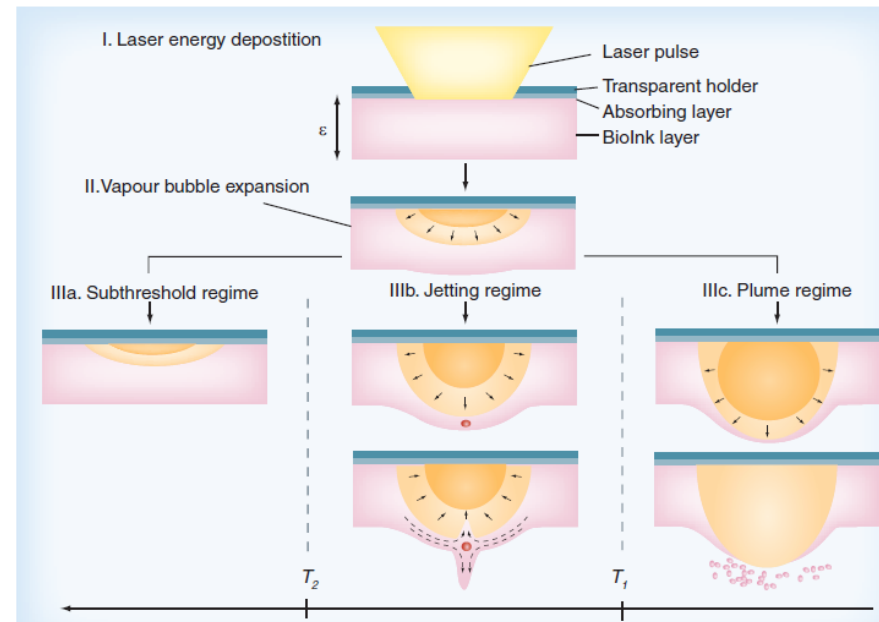
- Koch, Lothar, et al. "Laser assisted cell printing." *Current pharmaceutical biotechnology* 14.1 (2013): 91-97.
- Fernández-Pradas et al. Production of miniaturized biosensors through laserinduced forward transfer. *Proc. SPIE*, 2007, 6592, 65920R.

+ Liquid Induced Transfer Forward (LIFT)



Meccanismo di espulsione della goccia

- L'energia del laser deve essere in un **preciso range** per permettere la fuoriuscita della goccia
- **Lo spessore, la visosità e la tensione superficiale** del ribbon influenzano tale range di energia.

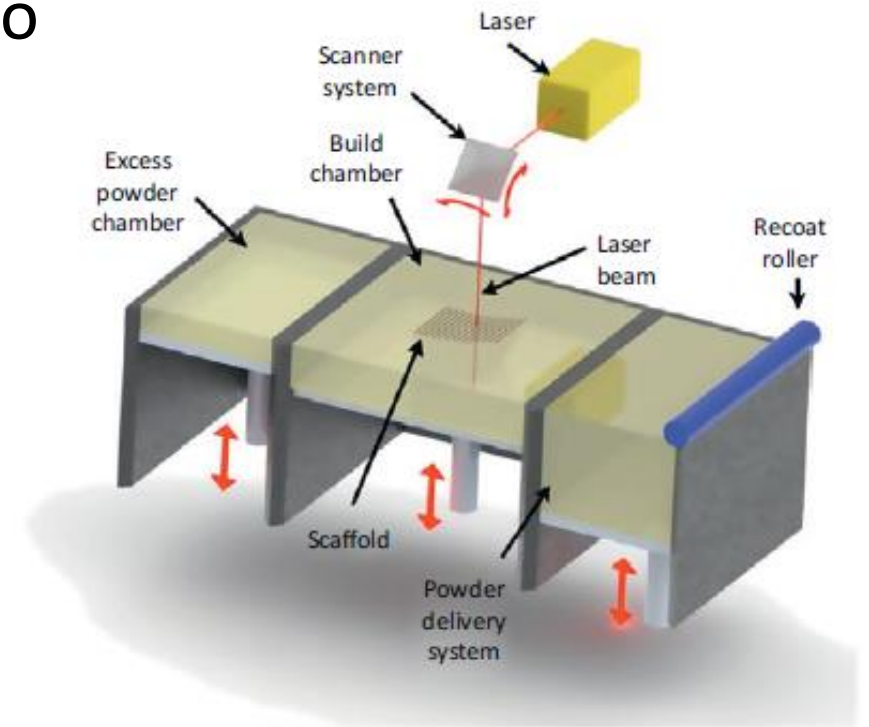


+ Laser Sintering



+ Laser Sintering

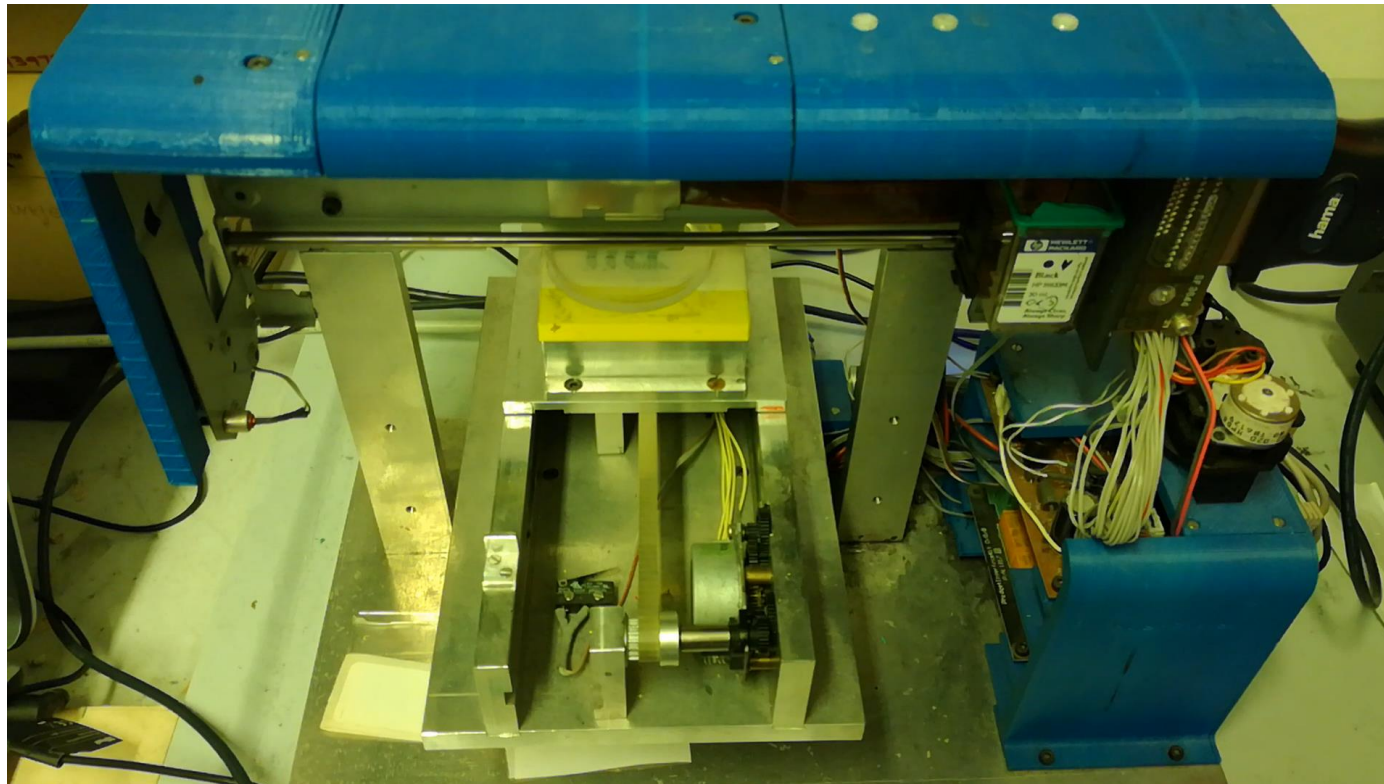
- Utilizza un **letto di grani** polimerici o metallici che vengono **localmente fusi** da un **fascio laser** strato per strato ottenendo il pezzo finale.
- Materiali:
 - **Metalli** (e.g. titanio, lega cobalto-cromo, ...)
 - **Polimeri** (e.g. Nylon, PVC, ABS, ...)



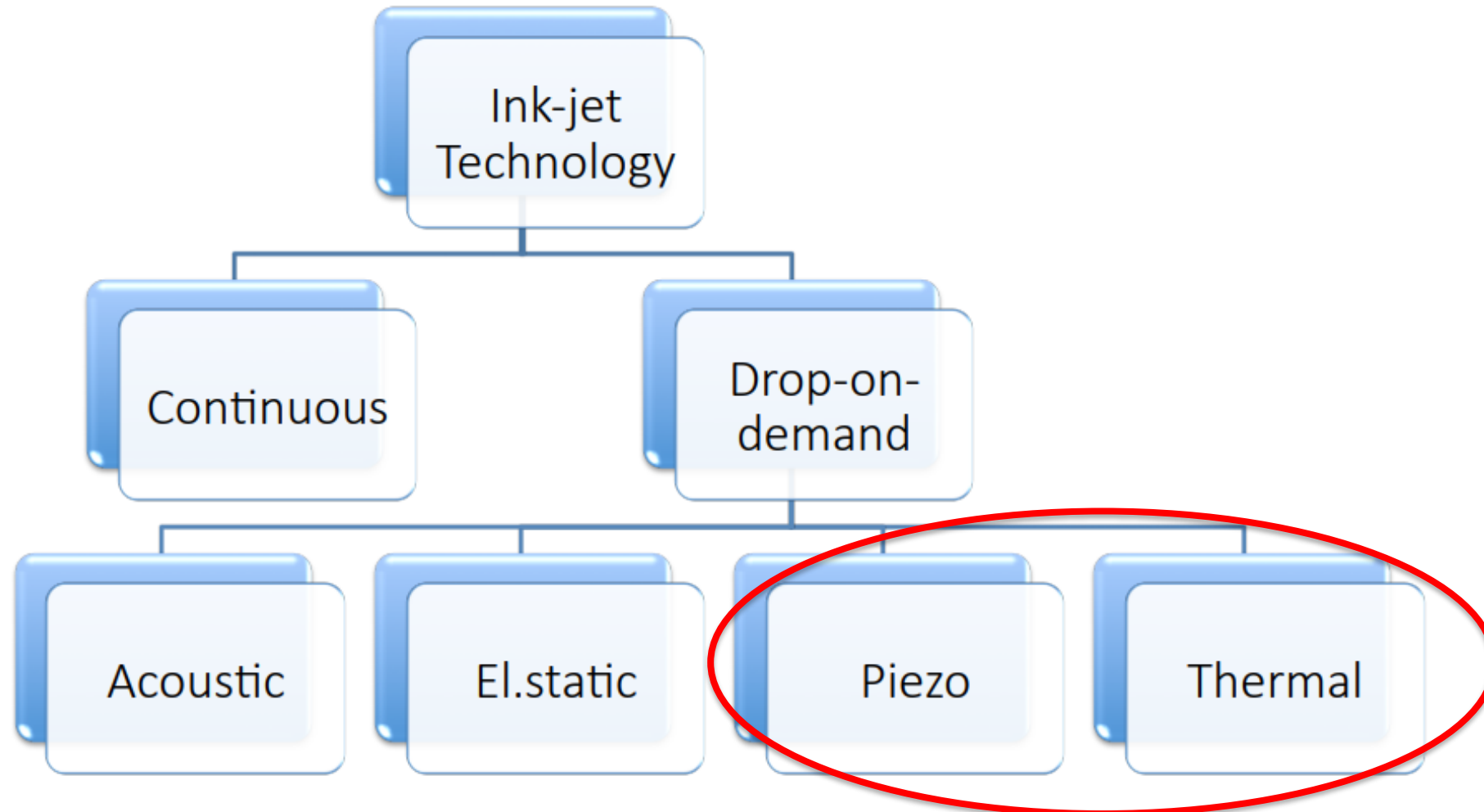
- Williams, Jessica M., et al. "Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering." *Biomaterials* 26.23 (2005): 4817-4827.
- Tan, K. H., et al. "Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends." *Biomaterials* 24.18 (2003): 3115-3123.

+ Stampa inkjet

- Tecnologia di stampa **contact free** che si basa sulla **deposizione di gocce di materiale** su un substrato controllandone il volume (picolitro = 10^{-12} litri) e la posizione.
- Orifizi con diametro di 50 – 80 μm



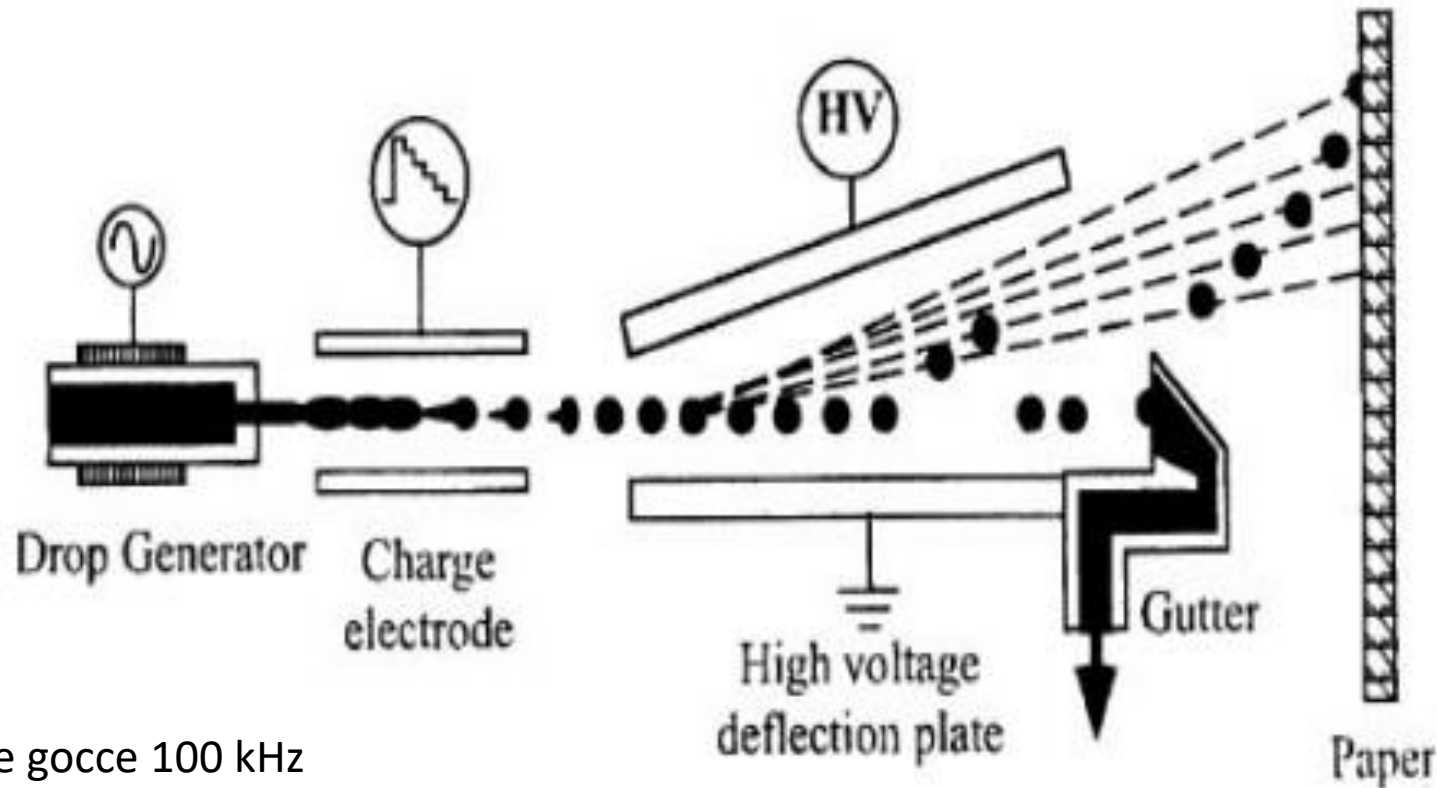
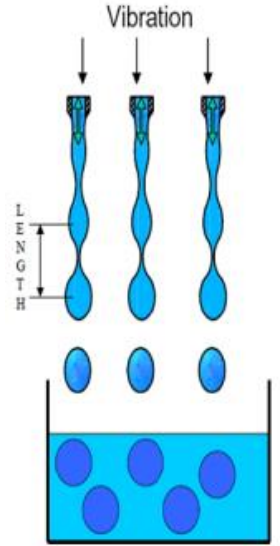
+ Stampa inkjet



- Cui, Xiaofeng, and Thomas Boland. "Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology." *Biomaterials* 30.31 (2009): 6221-6227.
- Villar, Gabriel, Alexander D. Graham, and Hagan Bayley. "A tissue-like printed material." *Science* 340.6128 (2013): 48-52.

+ Stampa inkjet - Continua

Caratterizzata da uno **stream continuo di gocce** di materiale dovuto alla **instabilità di Plateau-Reyleigh** che trasforma una colonna di fluido in uno stream di gocce e si genera in seguito a una **perturbazione del liquido** contenuto nella **cartuccia**.



Frequenza di rilascio delle gocce 100 kHz

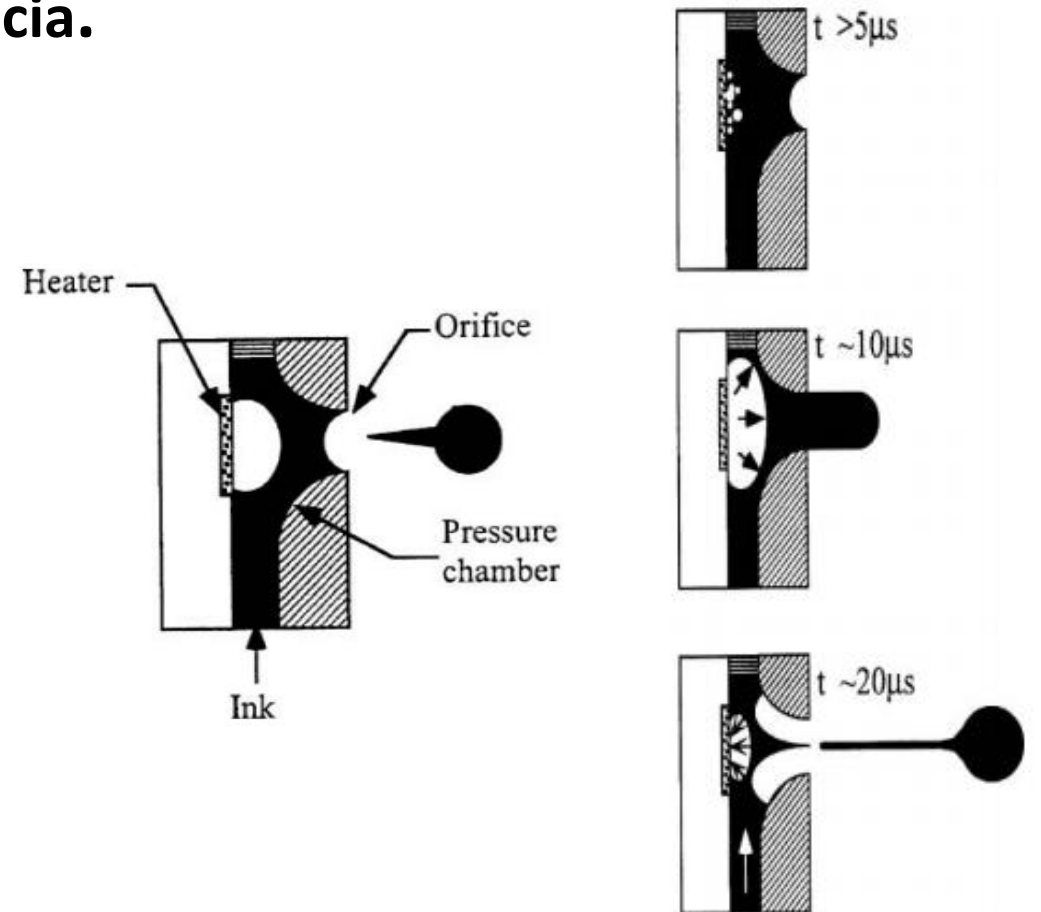
+ Stampa inkjet – Drop on Demand

Nella tecnologia drop on demand c'è un **segnale digitale** che attraverso un traduttore da un **impulso di pressione** (generato con un meccanismo termico o un meccanismo piezoelettrico) al fluido **generando la goccia**.

1. MECCANISMO TERMICO

É presente un **riscaldatore** che riscalda l'inchiostro ($T \approx 300^{\circ}\text{C}$) provocando la nucleazione di una **bolla di vapore** dell'inchiostro stesso che **espandendosi** velocemente produce la **fuorisuscita** di una **singola goccia d'inchiostro**.

Frequenza pari 4kHz e gocce di 32 pL



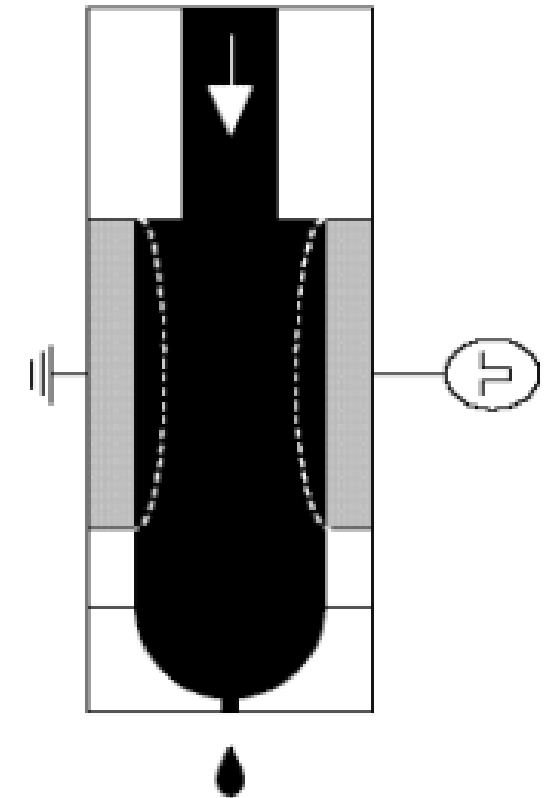
+ Stampa inkjet – Drop on Demand

Nella tecnologia drop on demand c'è un **segnale digitale** che attraverso un traduttore da un **impulso di pressione** (generato con un meccanismo termico o un meccanismo piezoelettrico) al fluido **generando la goccia**.

2. MECCANISMO PIEZOELETTRICO

É presente un *materiale piezoelettrico* a cui viene **applicata tensione**. Ciò comporta la **deformazione del materiale** che genera una pressione nel liquido con conseguente **formazione della goccia**.

Un grosso problema di questa tecnologia è la **miniaturizzazione del piezo**



+ Stampa Inkjet



Le principali **tipologie di inchiostri** sono:

- Inchiostri a **base aquosa** con viscosità in un range ($2 - 8 \cdot 10^{-3}$ Pas) in cui possono essere **disperse materiale elettronico o materiale biologico**.
- **Inchiostri solidi** basati su **cere**, che vengono riscaldati prima della stampa
- Inchiostri a **base oleosa**
- Inchiostri **fotosensibili**

+ Tecnologie di stampa 3D che usano un approccio inkjet



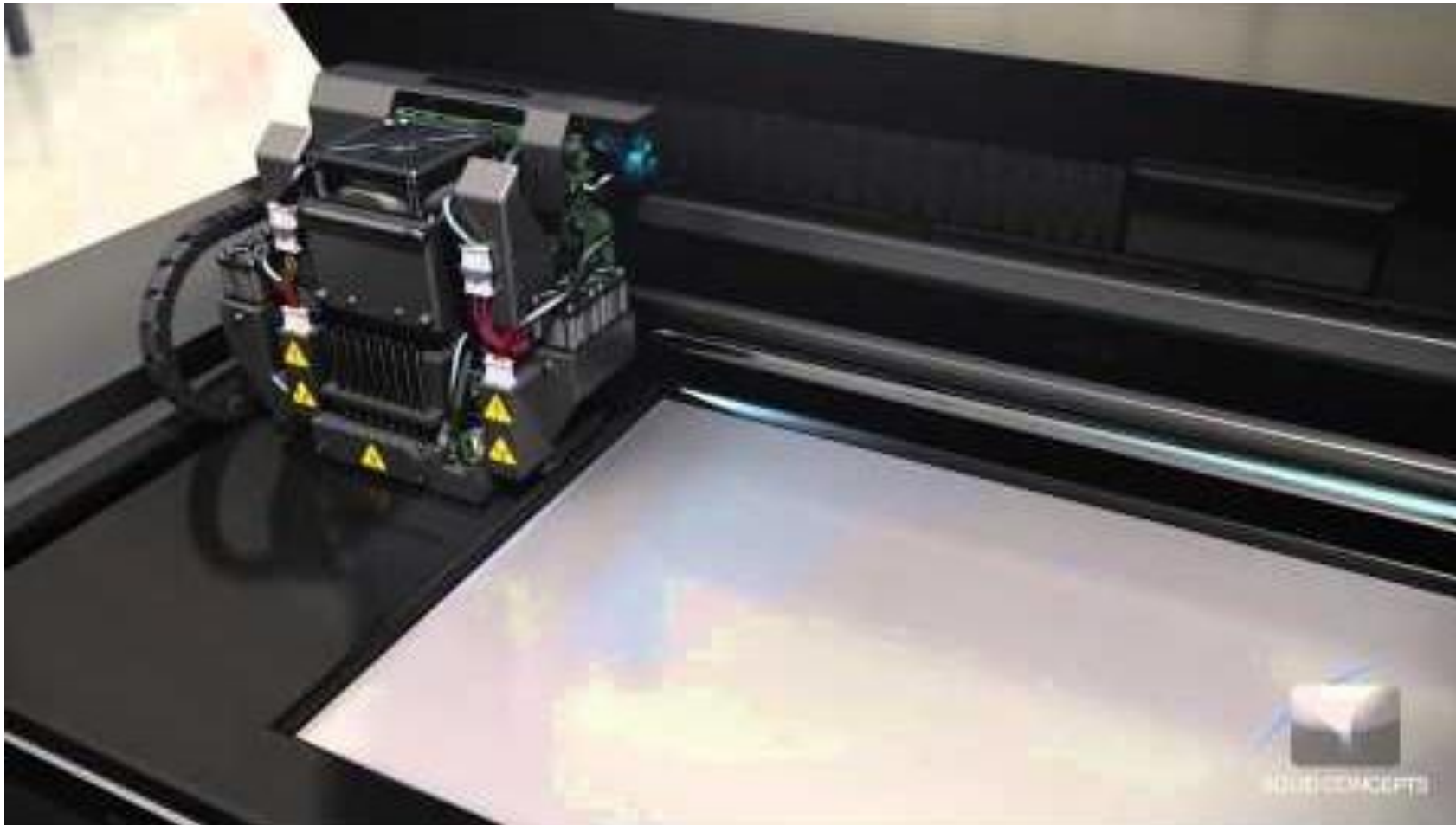
1. Polyjet

Vengono depositati inchiostri fotosensibili

2. Three dimensional printing (3DP)

Viene depositato un collante su un letto di polvere

+ Tecnologia Polyjet



+ Tecnologia Polyjet



- Utilizzo di **inchiostri fotosensibili nell'UV** (stereolitografia + inkjet)
- Strato per strato viene **depositato l'inchiostro** sotto forma di **gocce** e successivamente alla deposizione, lo **strato** viene **polimerizzato con luce UV**
- Possibilità di utilizzare **più inchiostri** nella fase di stampa per ottenere strutture **multi-materiale**

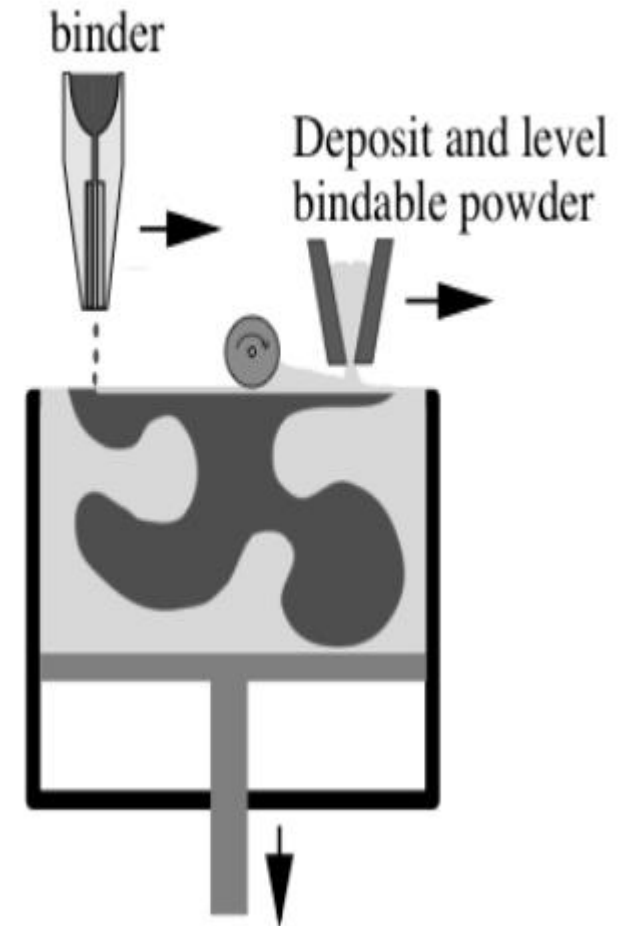


+ Tecnologie a getto di collante (binder jetting)



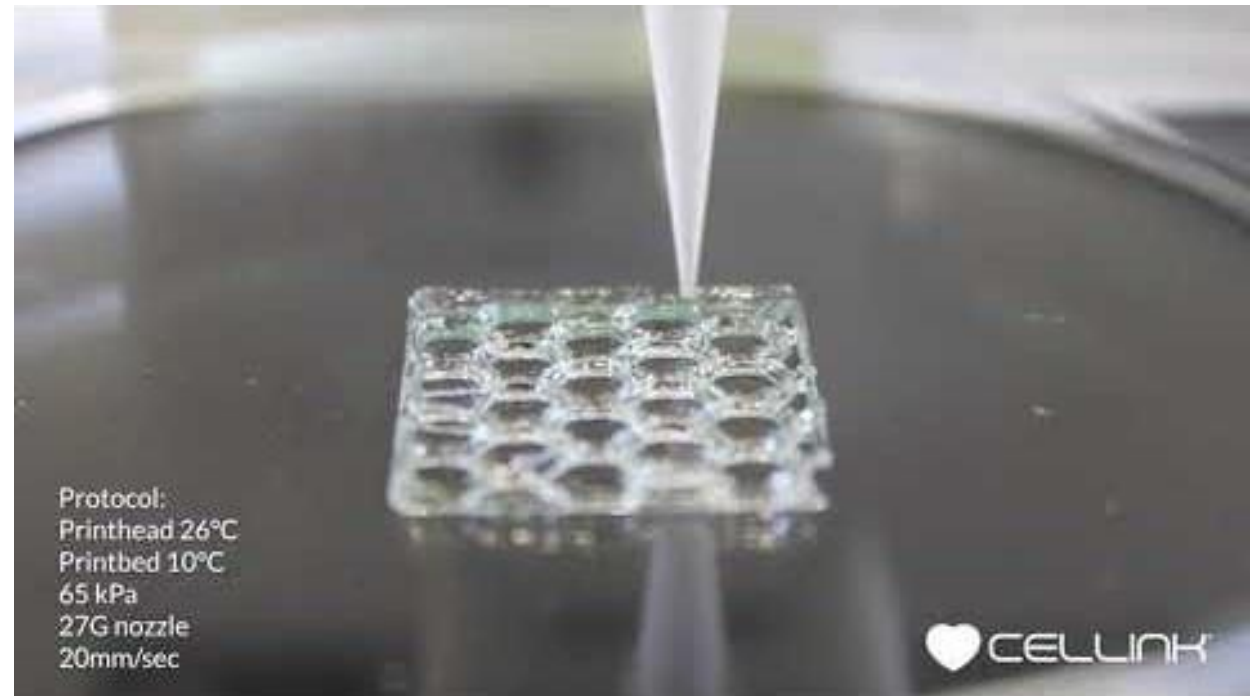
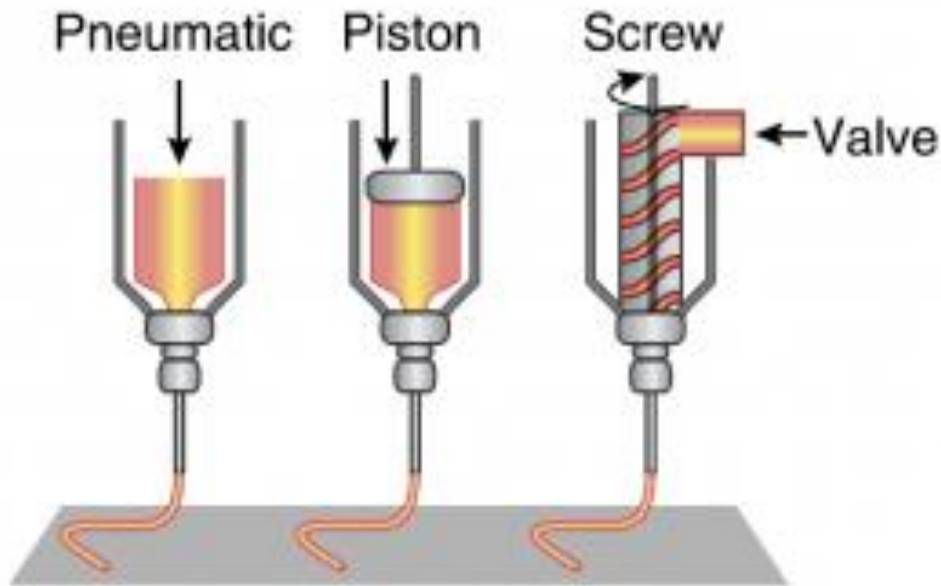
+ Tecnologie a getto di collante

- Tecnologia a **getto di collante**, definite **3D printing™**
- Viene depositato su un **letto di polvere** un **collante** in punti specifici che **lega la polvere** sullo strato in superficie.
- Materiali: inizialmente utilizzata per **materiali ceramici** con soluzioni acquose come binder, attualmente si usa anche per materiali polimerici (PCL + cloroformio)



+ Stampa 3D ad estrusione

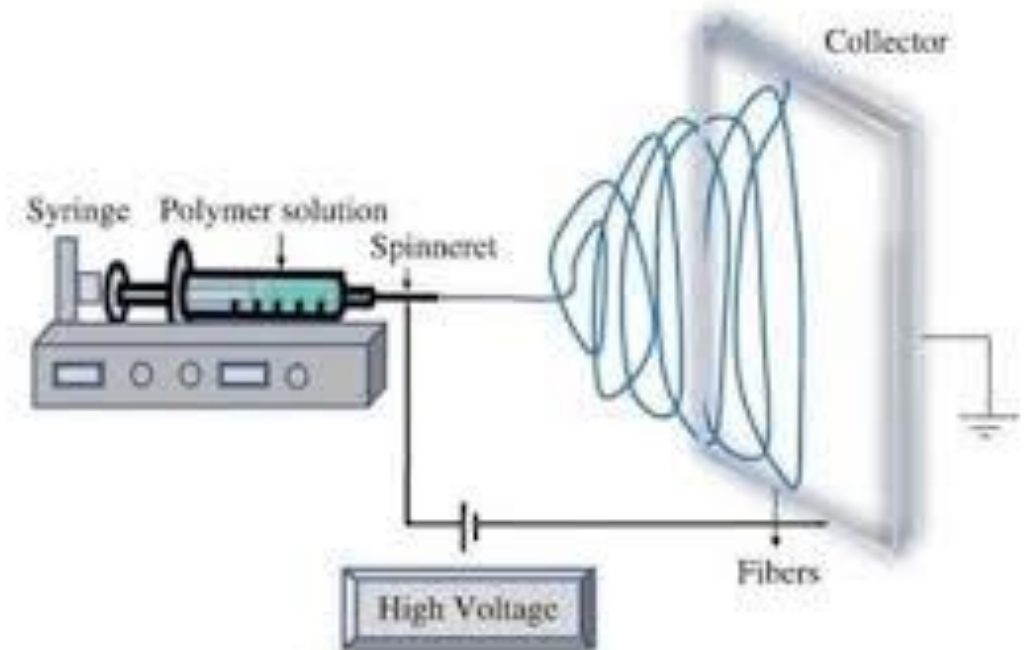
- Tecnologia di stampa 3D più utilizzata nella **biofabbricazione**
- Si basa sulla **deposizione continua** di **materiale polimerico** attraverso un ago
- Come forza motrice possono essere utilizzati sistemi ad **aria compressa**, a **pistone** o a **vite**.



- Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76, 321-343.
- Jungst T, Smolan W, Schacht K, Scheibel T and Groll J 2015. Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels *Chem. Rev.* 116 1496–539

+ Electrospinning

- L'electrospinning utilizza un elevato **campo elettrico** (generatore di alta tensione 5-50 kV) per fabbricare **fibre micrometriche e nanometriche** a partire da una soluzione polimerica.
- Il materiale è inserito all'interno di una siringa collegata a una pompa

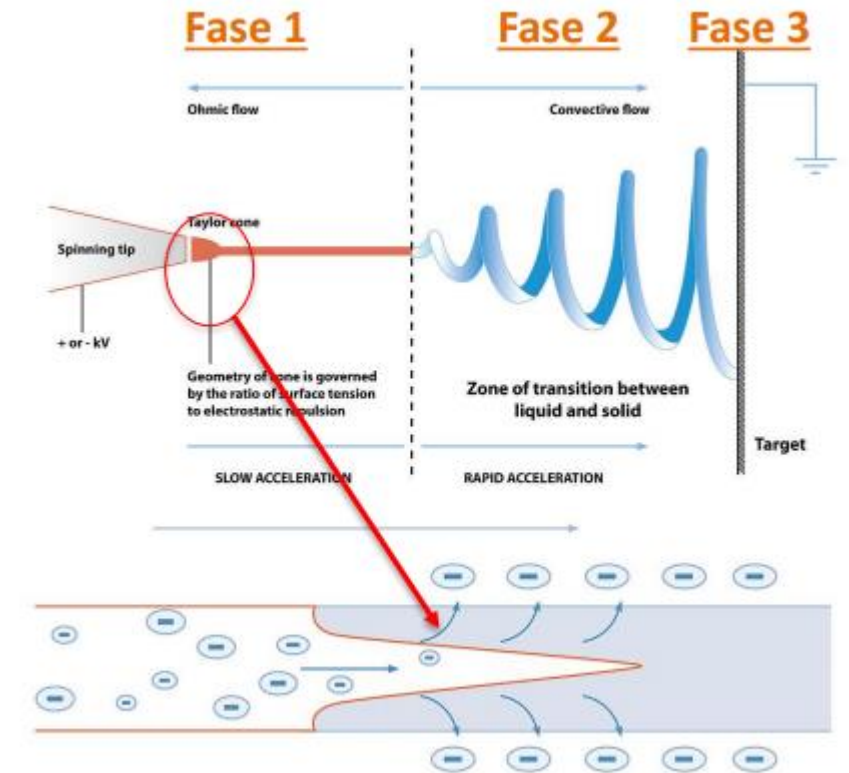


- Li, Wan-Ju, et al. "Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering." *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 60.4 (2002): 613-621.
- Liang, Dehai, Benjamin S. Hsiao, and Benjamin Chu. "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications." *Advanced drug delivery reviews* 59.14 (2007): 1392-1412.

+ Electrospinning

Il processo di **electrospinning** può essere suddiviso in **3 fasi principali**:

1. Formazione di **una goccia** di materiale sull'ago ed **allungamento del getto** in direzione assiale grazie all'elevato campo elettrico
2. Ulteriore **allungamento del getto**, accompagnato da una **diramazione e/o suddivisione** del getto
3. **Evaporazione del solvente** contenuto nella soluzione evapora lasciando la **fibra polimerica carica** che si **solidificano sul collettore**



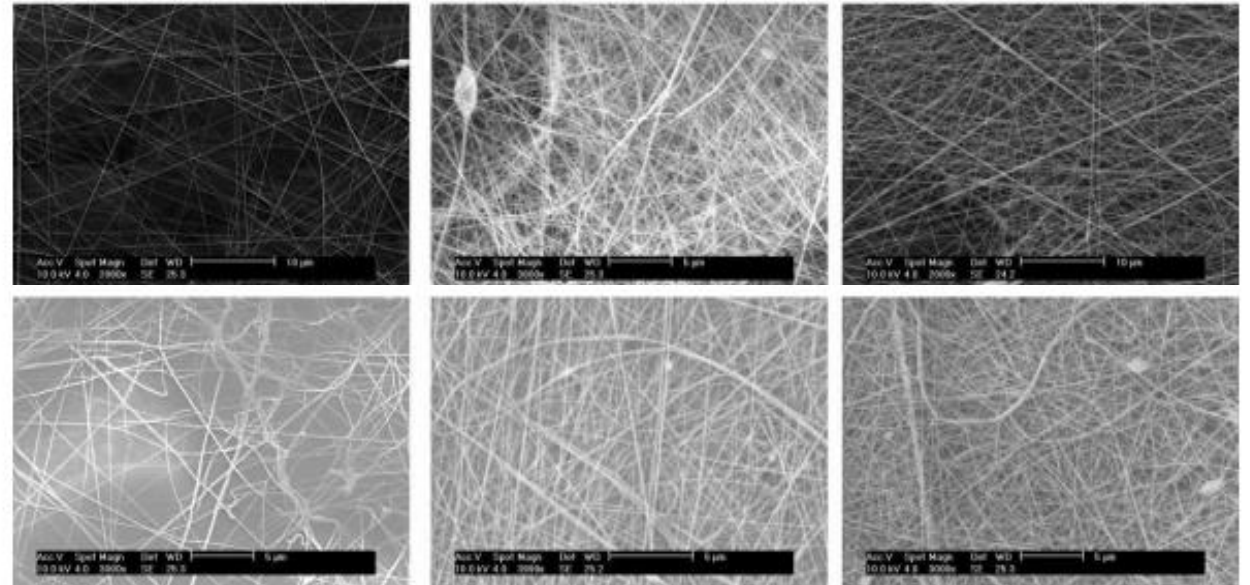
+ Electrospinning

La morfologia della fibra dipende da

- **Proprietà della soluzione** (peso molecolare, concentrazione, viscosità, densità superficiale di carica, ...)
- **Parametri di processo** (voltaggio, flusso, tipo di collettore, diametro dell'ago, ...)
- **Parametri ambientali** (Temperatura, umidità, ...)



Membrane con spessore 10-100 μm
Diametro delle fibre 0.1-10 μm



+ Elettrospinning

Materiali utilizzabili:

- **Polimeri naturali** (gelatina, chitosano, fibroina di seta, ...)
- **Polimeri sintetici** (PGA, PLA, PCL, PMMA, ...)
- **Materiali ceramici**

Questi materiali devono essere sciolti in un **solventi**:

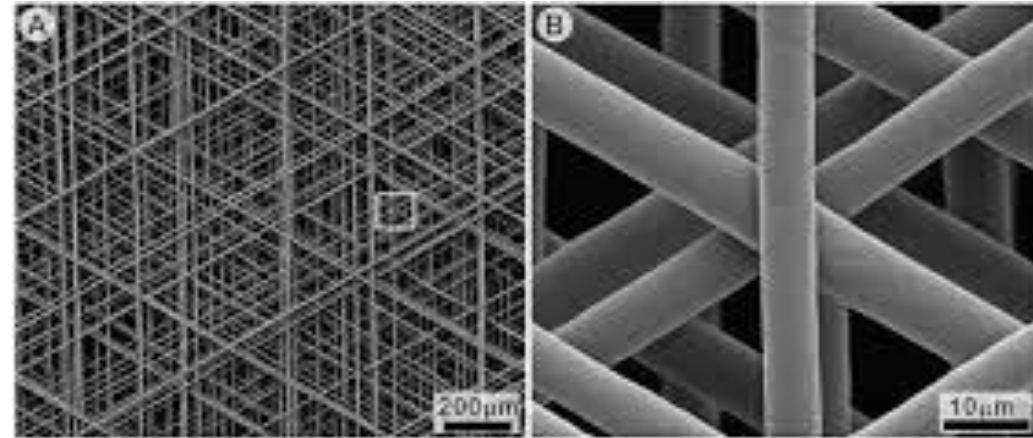
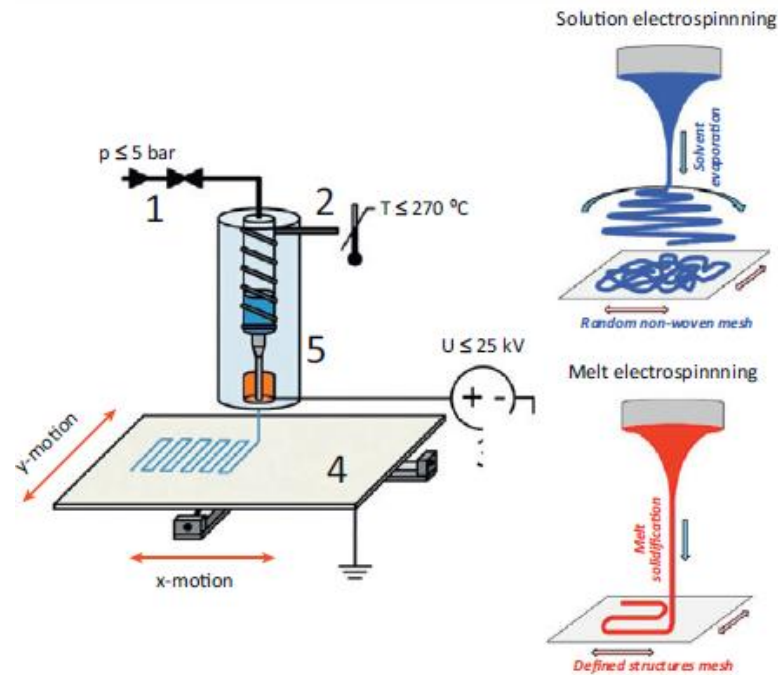
- Acido acetico
- Acido formico
- Cloroformio



+ Melt elettrospinning



Nasce dalla combinazione di tecniche extrusion-based e dell'elettrospinning

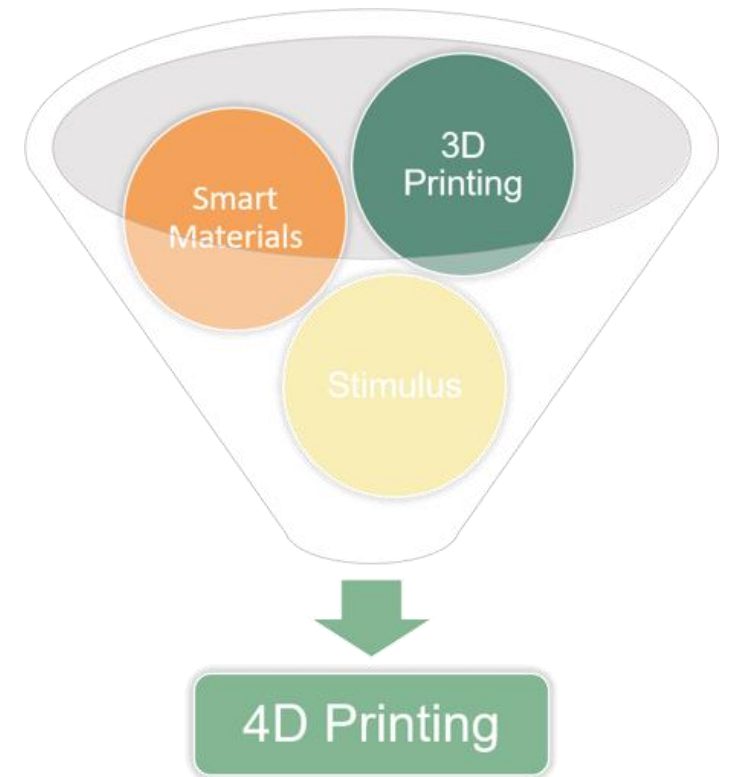


- Brown, T.D. et al. (2011) Direct writing by way of melt electrospinning. *Adv. Mater.* 23, 5651–5657
- Hochleitner, Gernot, et al. "Additive manufacturing of scaffolds with sub-micron filaments via melt electrospinning writing." *Biofabrication* 7.3 (2015): 035002.

+ Stampa 4D

Stampa 4D = stampa 3D + tempo

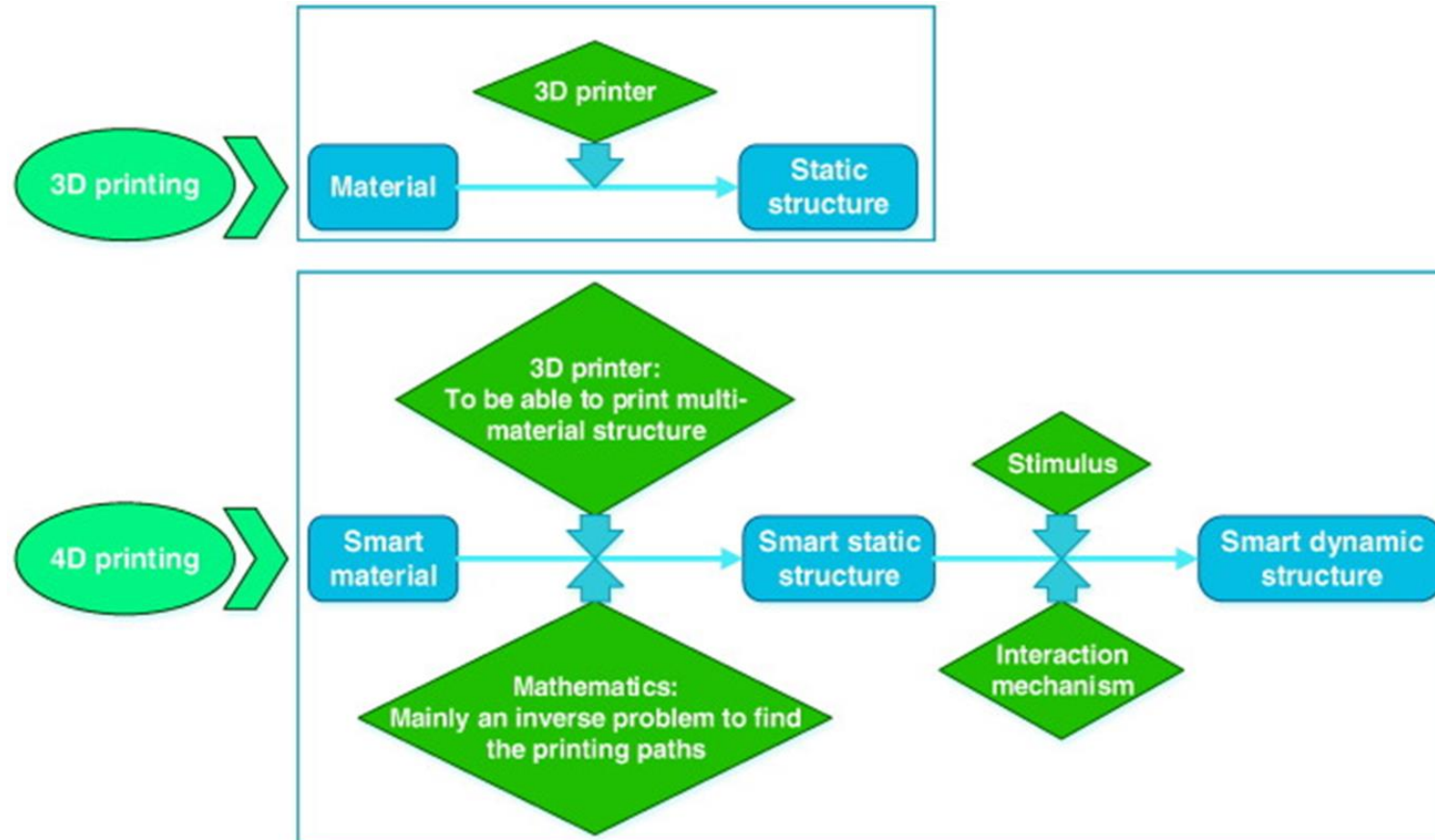
- La **forma, le proprietà e le funzionalità** di un **oggetto stampato in 3D** possono **cambiare in maniera programmata** in funzione del **tempo**.
- La stampa 4D è una tecnica di fabbricazione additiva di **oggetti in grado di auto-trasformarsi** se sottoposti a un **predeterminato stimolo** (calore, corrente, luce ultravioletta, pressione osmotica, ...)



+ Stampa 4D



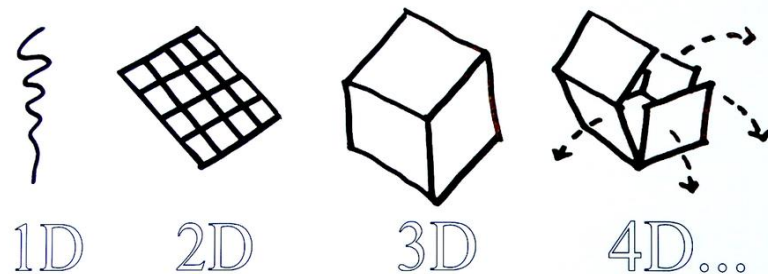
+ Stampa 3D VS Stampa 4D





+ Vantaggi della stampa 4D

- La **fabbricazione** di strutture 4D risulta **più facile** perchè spesso si parte da **strutture piane**.
- Il movimento **non** è dovuto all'energia **elettrica** → strutture adatte ad essere utilizzate in **ambienti pericolosi** e **nel corpo umano**.
- Utilizzo di materiali in grado di **autoripararsi**



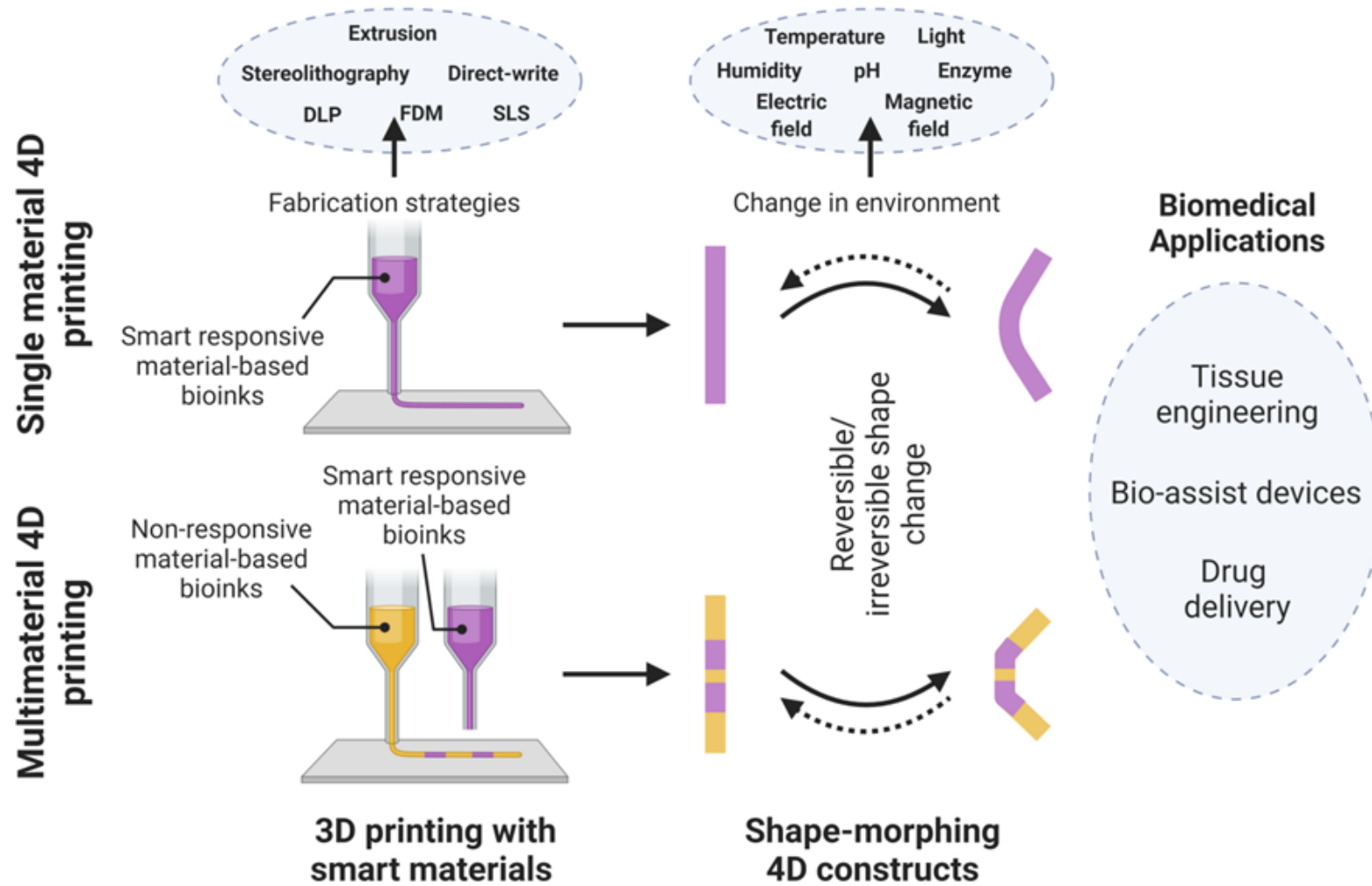
+ Stampa 4D



Utilizza **materiali intelligenti**: materiali in grado di cambiare le loro proprietà in funzione degli stimoli esterni.

- **Materiali a memoria di forma**
- **Polimeri responsivi** (temperatura dipendenti, pH-dipendenti, etc)

+ Stampa 4D: a singolo materiale VS multimateriale



+ Stampa 4D: Applicazioni in ambito bimedical



- Scaffolding
- Sistemi a rilascio controllato di farmaco
- Biosensori
- Dispositivi medici

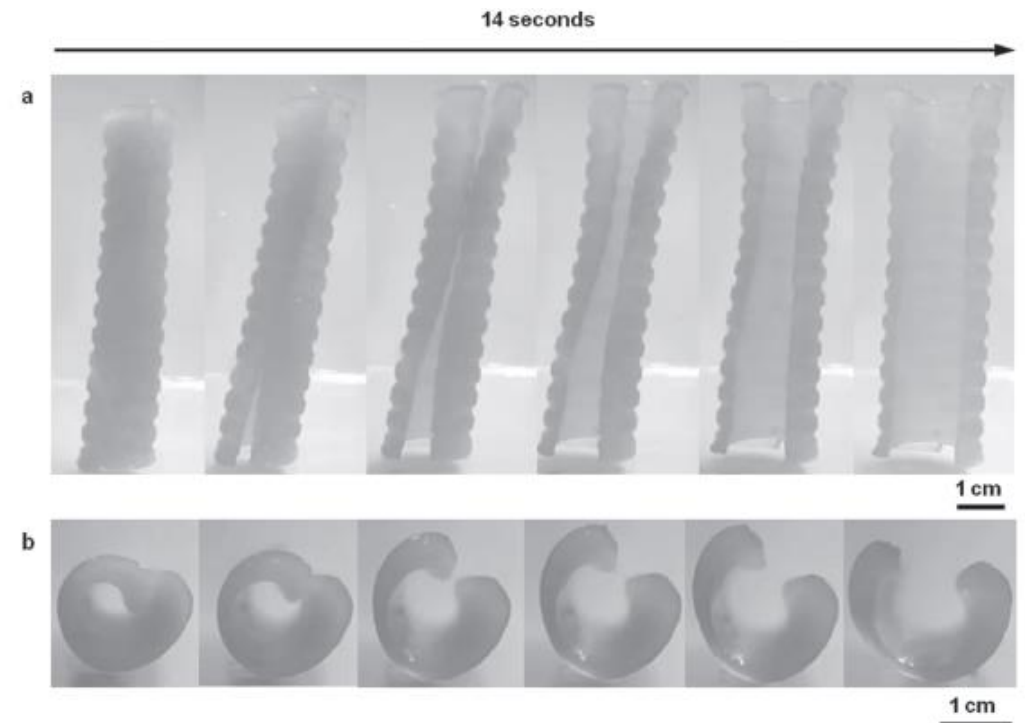
+ Stampa 4D: Applicazioni in ambito bimedical

Stent per le vie aeree impiantabile

Materiale: PCL metacrilato

Tecnica utilizzata: Stereolitografia

Stimolo: Calore





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 Vozi, Ph.D
- Carmelo De Maria, Ph.D
- Aurora De Acutis, Ph.D
- Gabriele Maria Fortunato, M.Sc
- Amedeo Franco Bonati, M.Sc
- Simone Micalizzi, 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

