



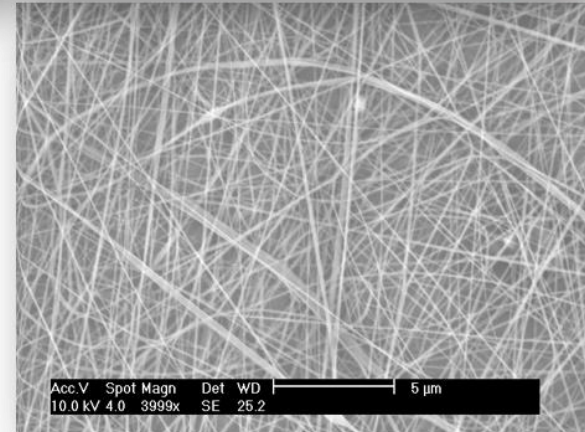
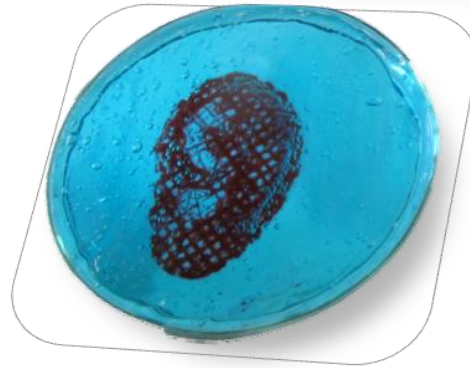
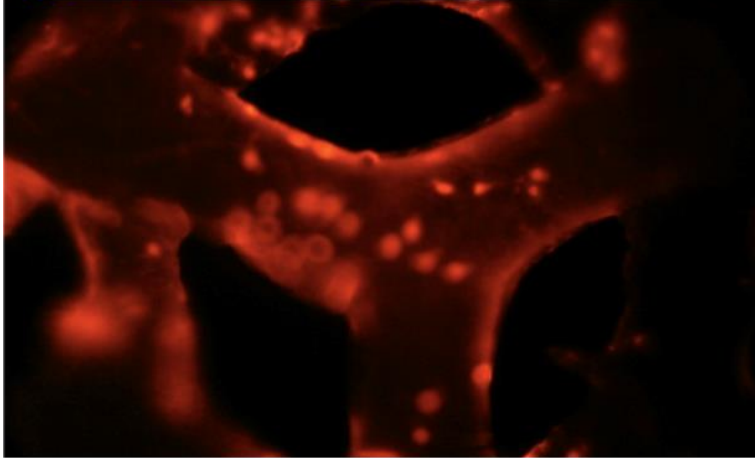
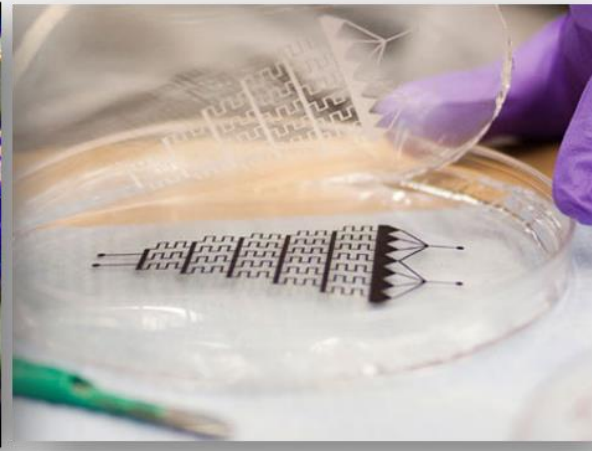
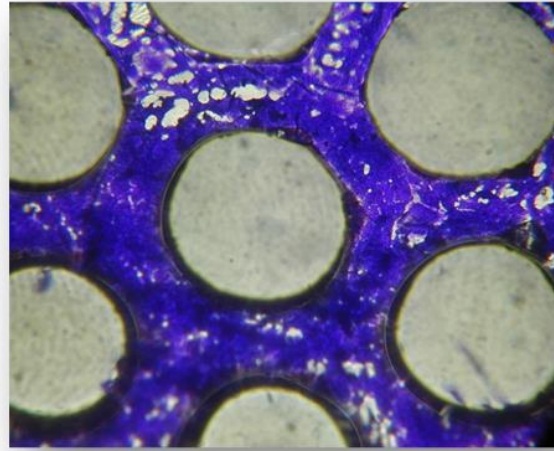
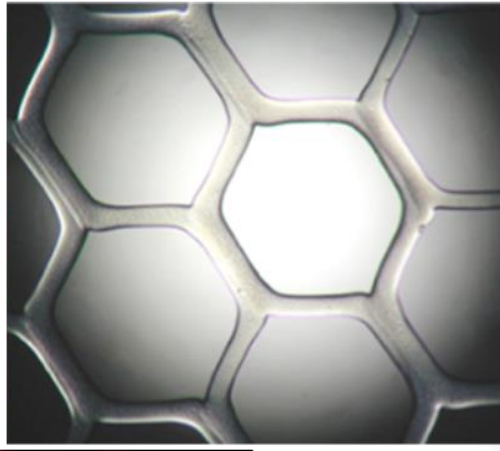
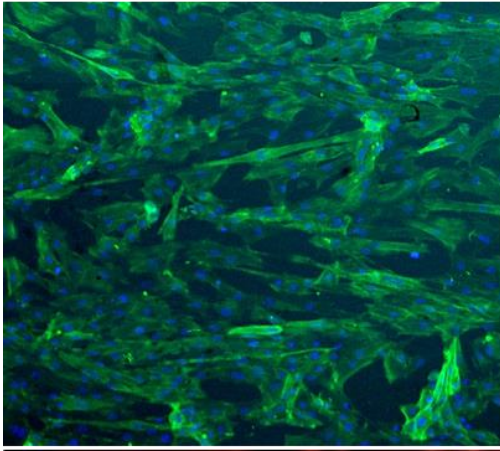
Centro E. Piaggio
bioengineering and robotics research center

Stampa 3D e biofabbricazione in ambito biomedicale



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

irene.chiesa@phd.unipi.it



Biofabbricazione, Bioassembly e Bioprinting

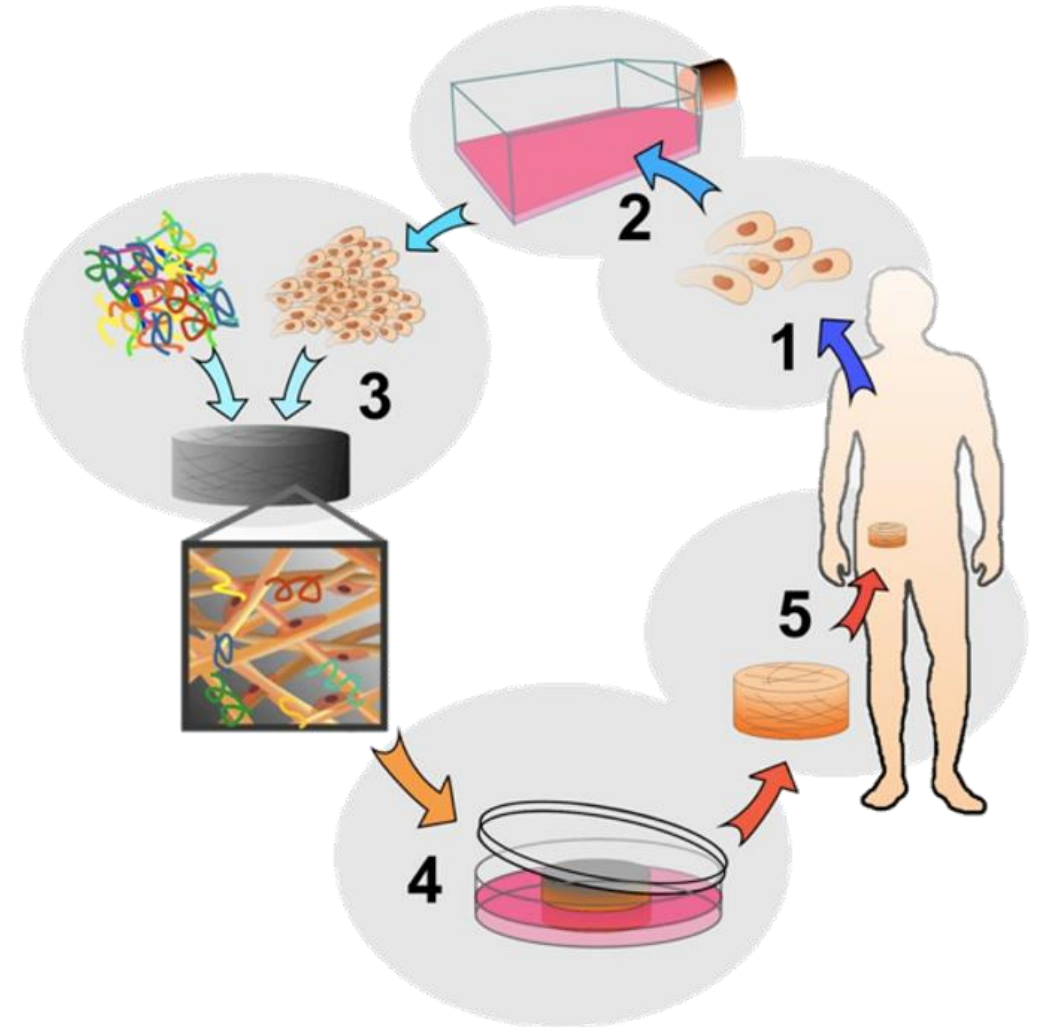
+ Medicina rigenerativa e ingegneria dei tessuti



*La medicina rigenerativa è una materia **interdisciplinare** che combina principi dell'**ingegneria tessutale** alla **medica** e alla **biologia** per **sviluppare costrutti in vitro** in grado di **studiare, ristabilire o sostituire un certo tessuto umano***

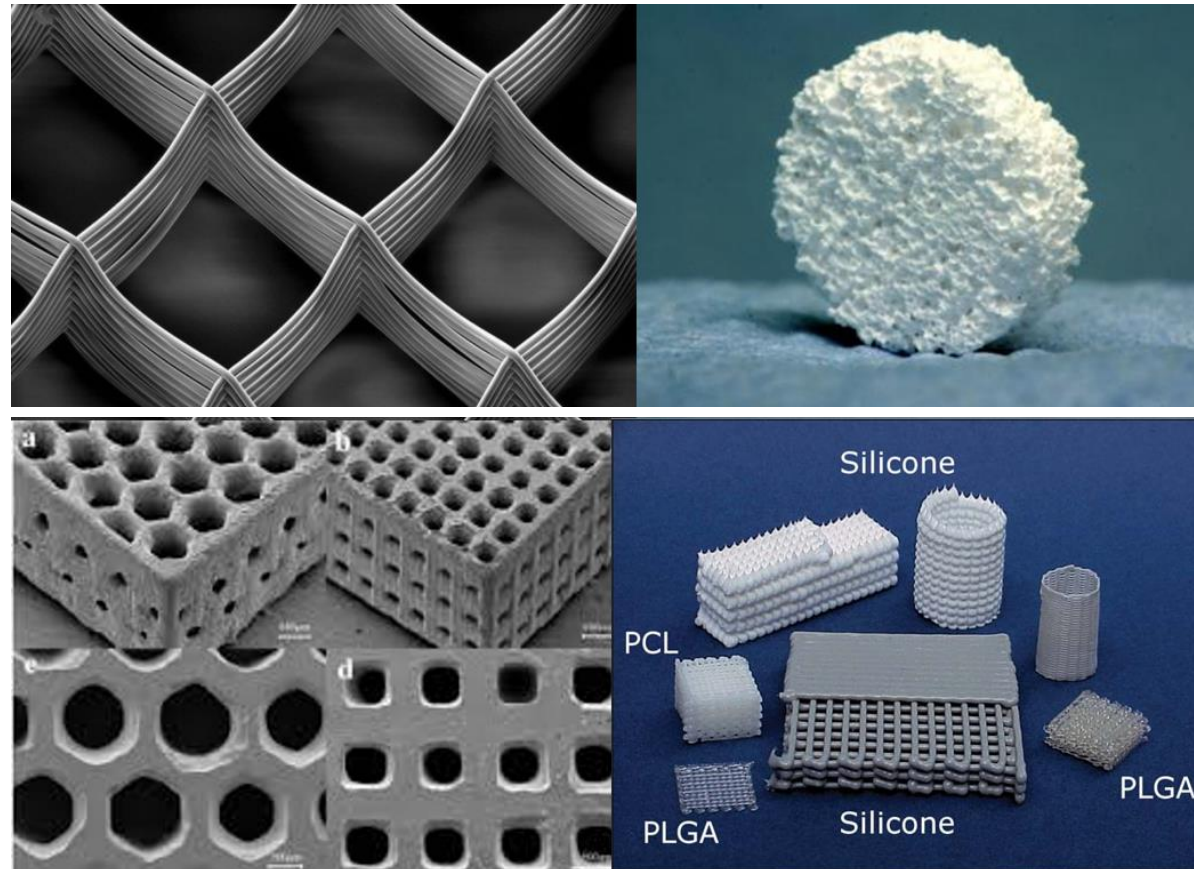
+ Paradigma classico

- Scaffold
- Cellule
- Fattori di Crescita



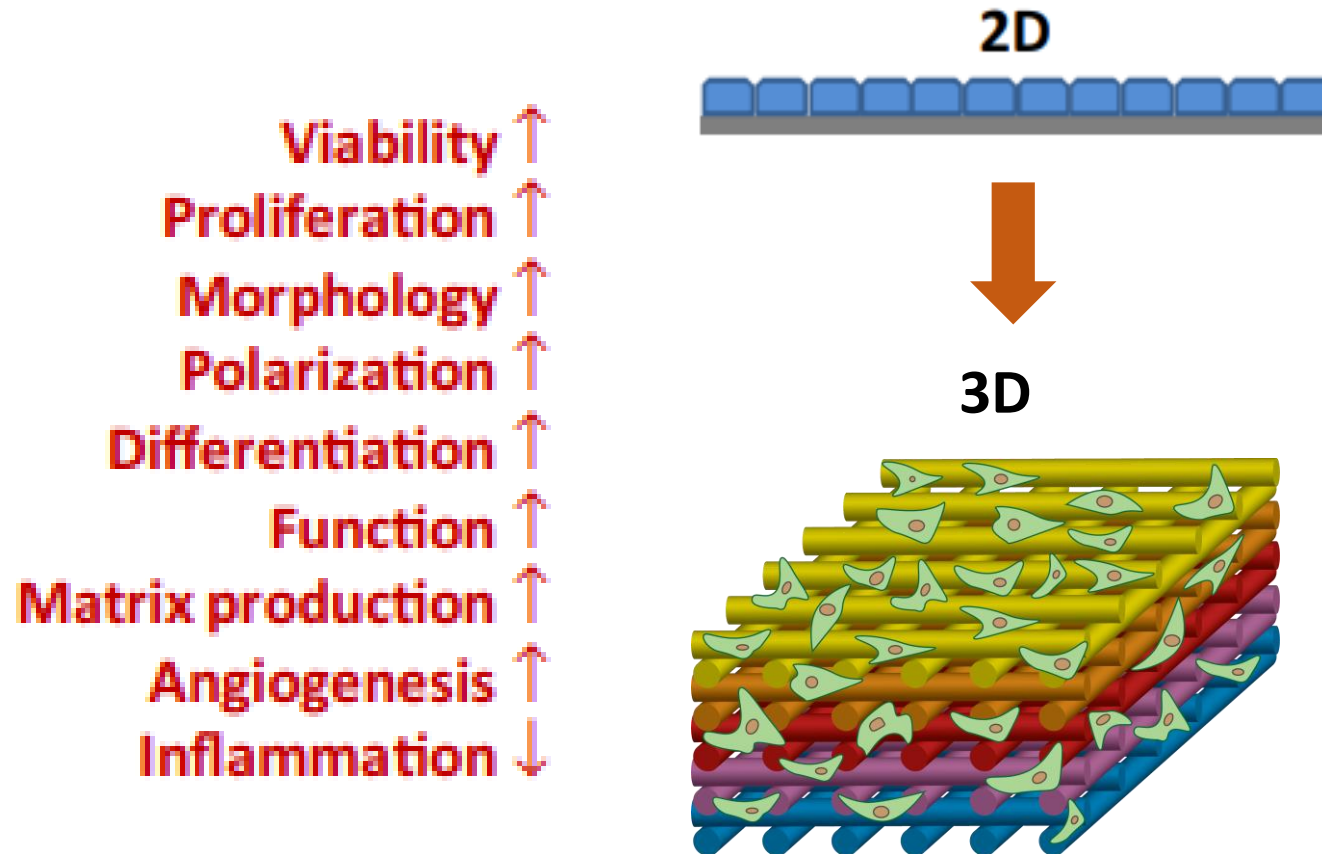
+ Scaffold

Strutture tridimensionali e porose che forniscono un **supporto meccanico** alle **cellule** in crescita con il fine di rigenerare il tessuto di interesse.



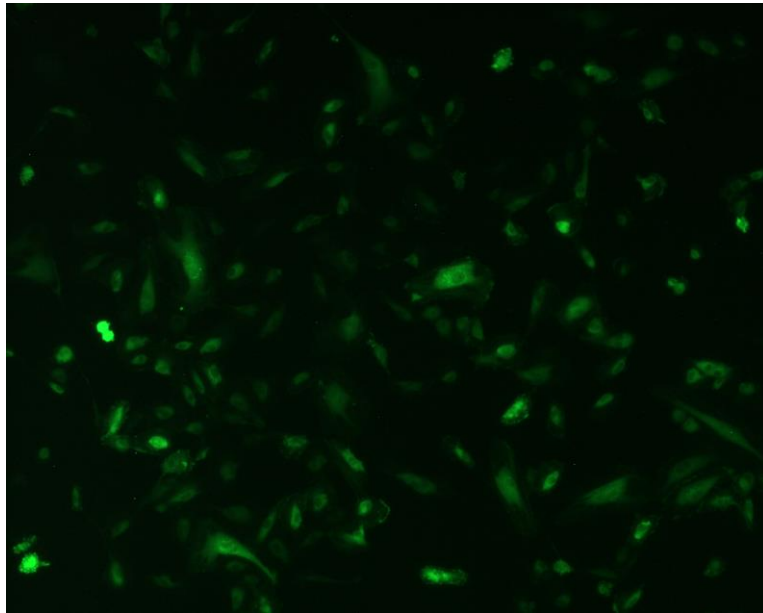
+ Scaffold: 2D vs 3D

Strutture tridimensionali e porose che forniscono un **supporto meccanico** alle **cellule** in crescita con il fine di rigenerare il tessuto di interesse.



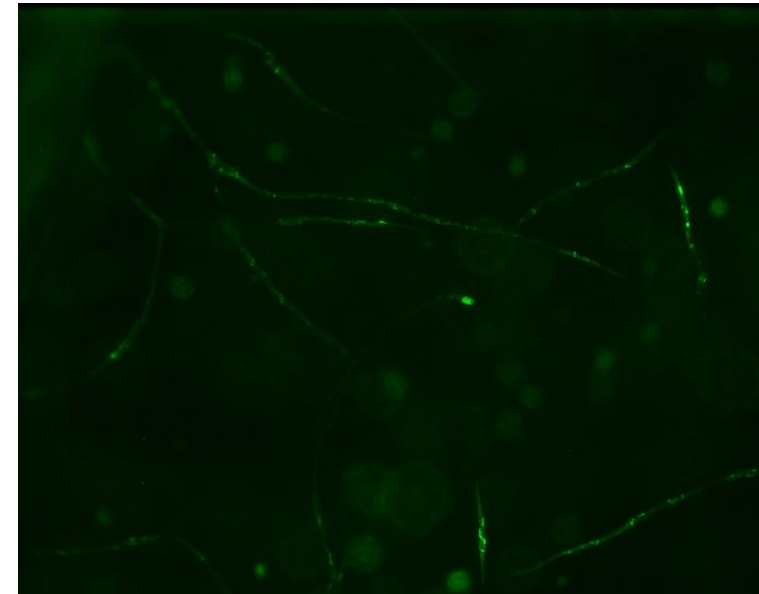
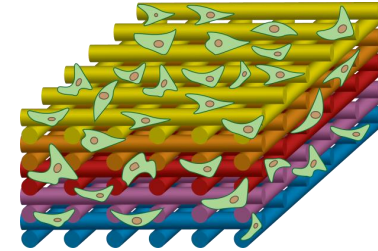
+ Scaffold: 2D vs 3D

2D



HUVECs coltivate in fiasca

3D



HUVECs coltivate uno scaffold 3D in fibrina



+ Scaffold



Uno **scaffold ideale** dovrebbe:

- Essere **biocompatibile**.
- Promuovere **l'adesione cellulare** e **l'attività cellulare**.
- **Fornire segnali** simili a quelli della matrice extracellulare.
- **Mimare il tessuto** si interesse attraverso le sue **proprietà meccaniche** (modulo di Young, comportamento a fatica, modulo a compressione) e **superficiali** (idrofilicità e rugosità).
- **Integrarsi** in maniera appropriata con il tessuto ospite dopo l'impianto

+ Scaffold – Materiali

1. Polimeri sintetici

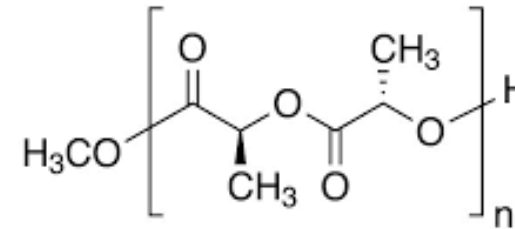
PLLA, PCL, PVC, PVA, PET, etc...

Vantaggi:

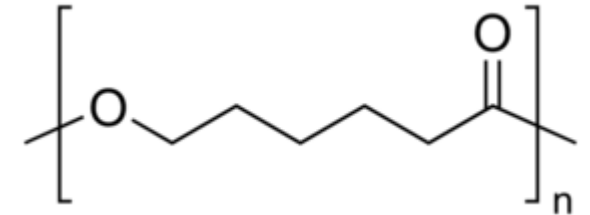
- Facile sintetizzazione
- Proprietà altamente riproducibili
- Facili da processare

Svantaggi:

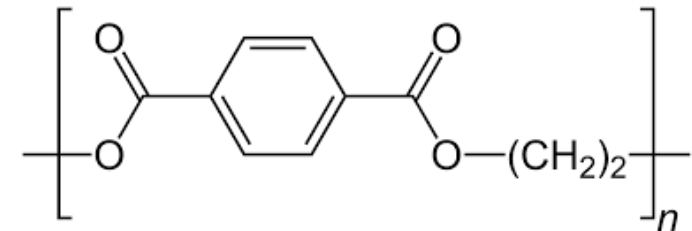
- Bassa biocompatibilità e biodegradabilità



PLLA



PCL



PET



+ Scaffold – Materiali

2. Polimeri naturali

Gelatina, collagene, pectina, fibroina di seta, etc...

Vantaggi:

- Altamente biocompatibili
- Presentano sequenze (es: sequenza RGD) in grado di influenzare il comportamento cellulare

Svantaggi:

- Differenze tra diversi lotti
- Rischi di contaminazioni
- Difficili da processare



+ Scaffold – Materiali

3. **Materiali ceramici** (per tessuto osseo)

Idrossiapatite, tricalcio fosfato, biovetri, ...

Vantaggi:

- Hanno proprietà osteoinduttive
- Mimano bene la componente inorganica dell'osso umano

Svantaggi:

- Inappropriati per mimare tessuti molli
- Sono fragili
- Presentano proprietà meccaniche minori rispetto all'osso *in vivo*



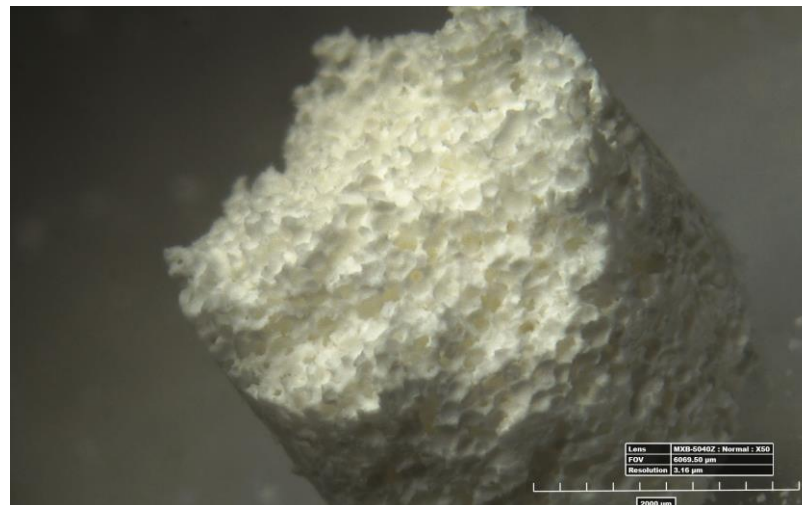
+ Scaffold – Tecniche di fabbricazione



Tecniche di fabbricazione convenzionali:

- Separazione di fase
- Liofilizzazione (freeze drying)
- Gas foaming

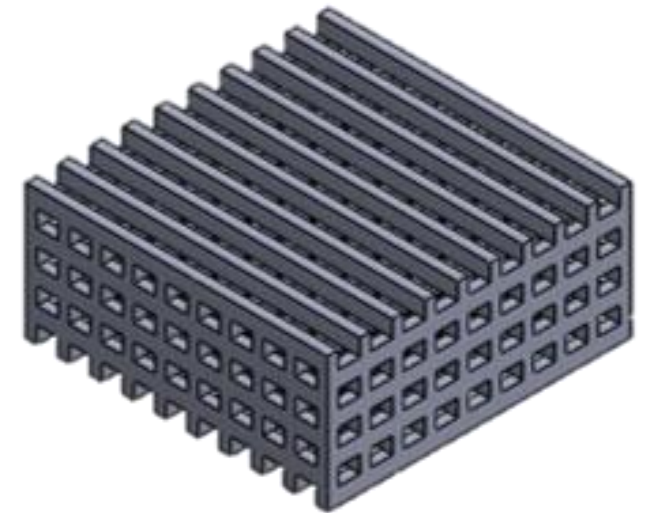
....



Tecniche di stampa 3D:

- Tecniche Extrusion-based
- Electrospinning
- Tecniche Light-based

....



+ Pro e Contro della stampa 3D per fabbricazione di scaffold



PRO

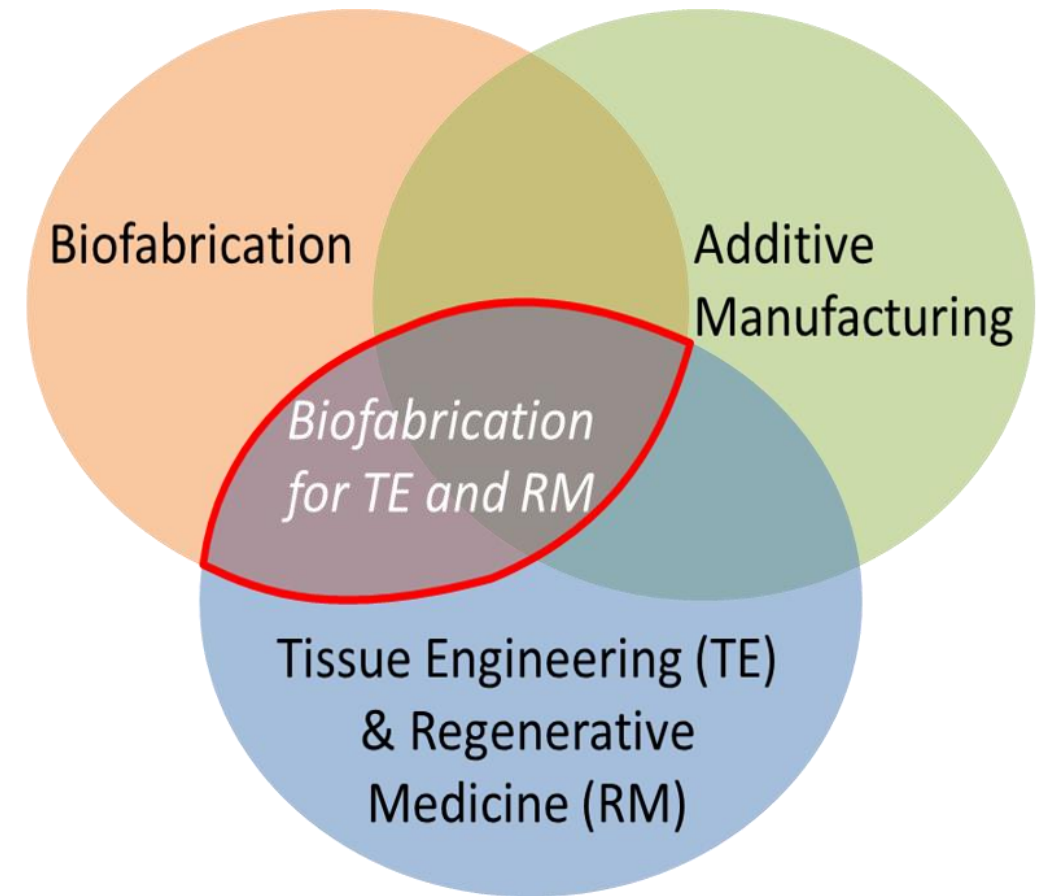
- Distribuzione precisa dei pori
- Aumento della complessità della forma
- Componenti multimateriale
- Personalizzazione del pezzo
-

CONTRO

- Costo più elevato
- Time consuming
-

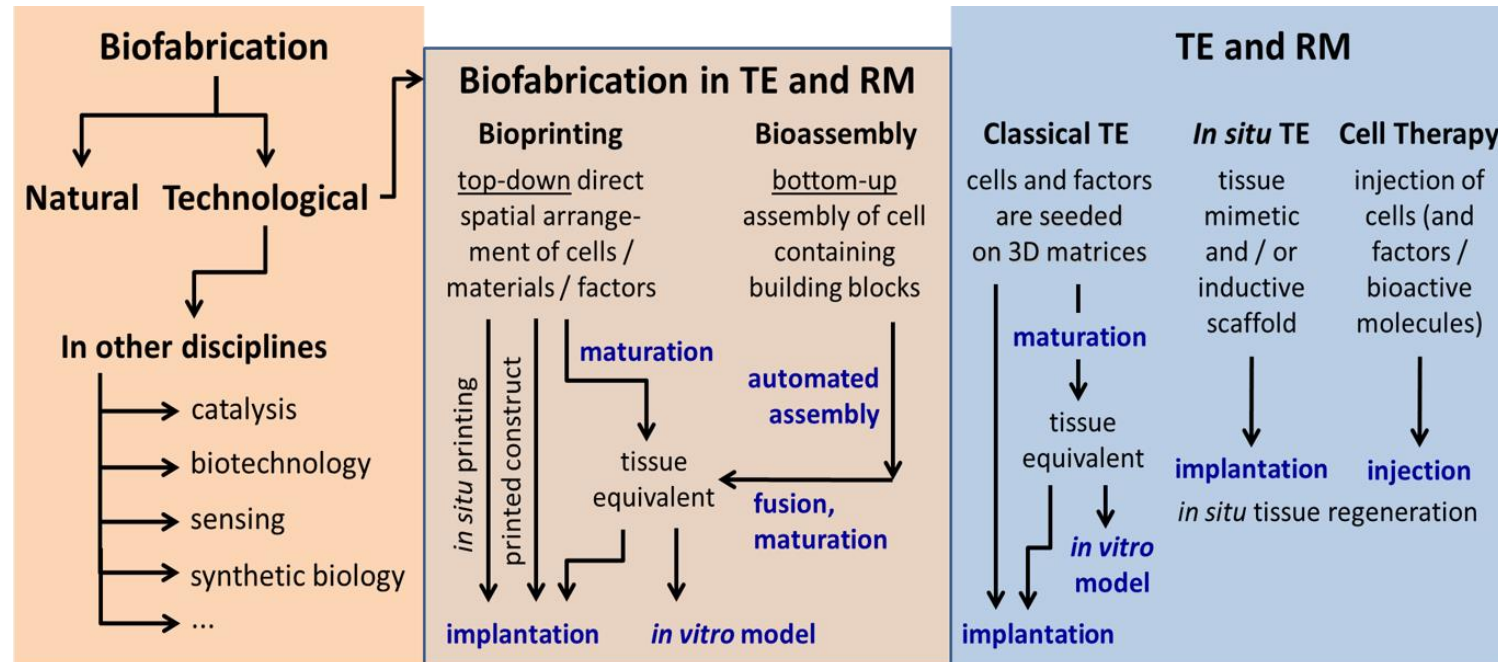
+ Biofabbricazione

*Per **biofabbricazione** si intende la **fabbricazione di costrutti biologicamente funzionali** con un'organizzazione strutturale a partire da cellule, micro-tessuti, molecole bioattive e/ biomateriali attraverso processi top-down (**bioprinting**) o processi bottom-up (**bioassembly**)*



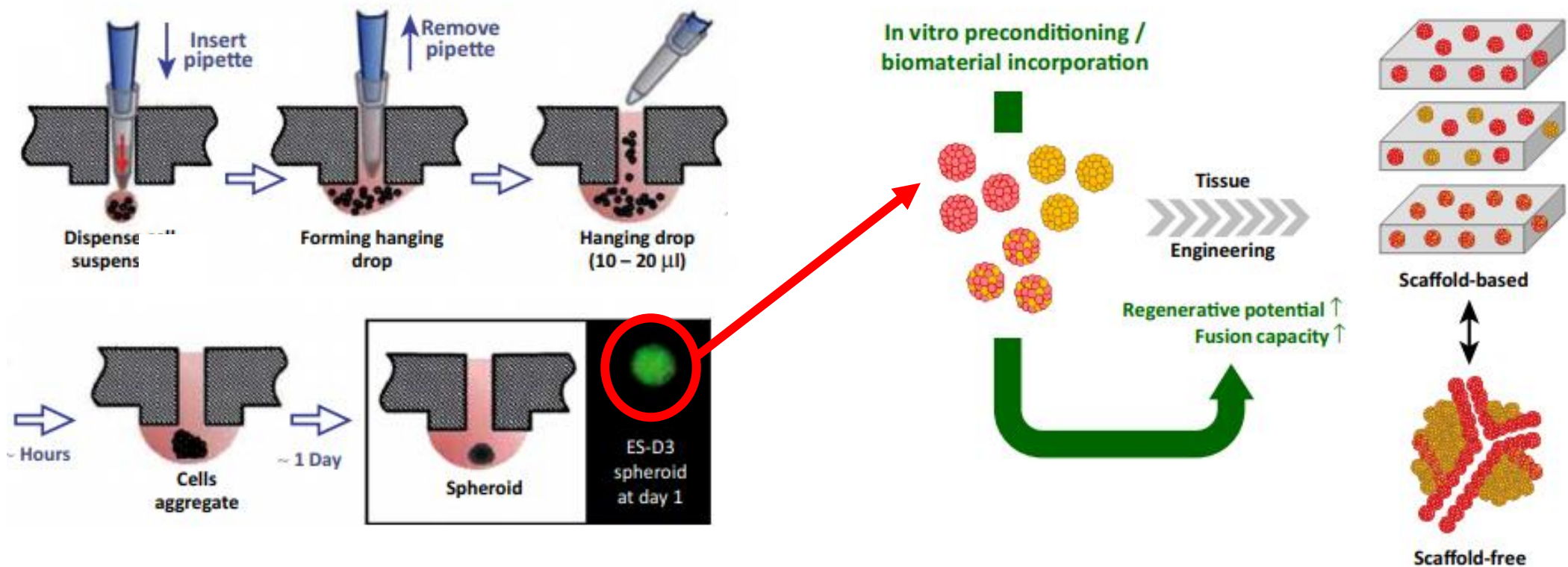
+ Bioassembly

- Fabbricazione di costrutti con una **predefinita organizzazione** 2D o 3D attraverso **l'unione automatica di unità base** preformate contenenti **cellule**.
- La fabbricazione delle unità avviene grazie alla **capacità di auto-organizzazione delle cellule**.



+ Bioassembly

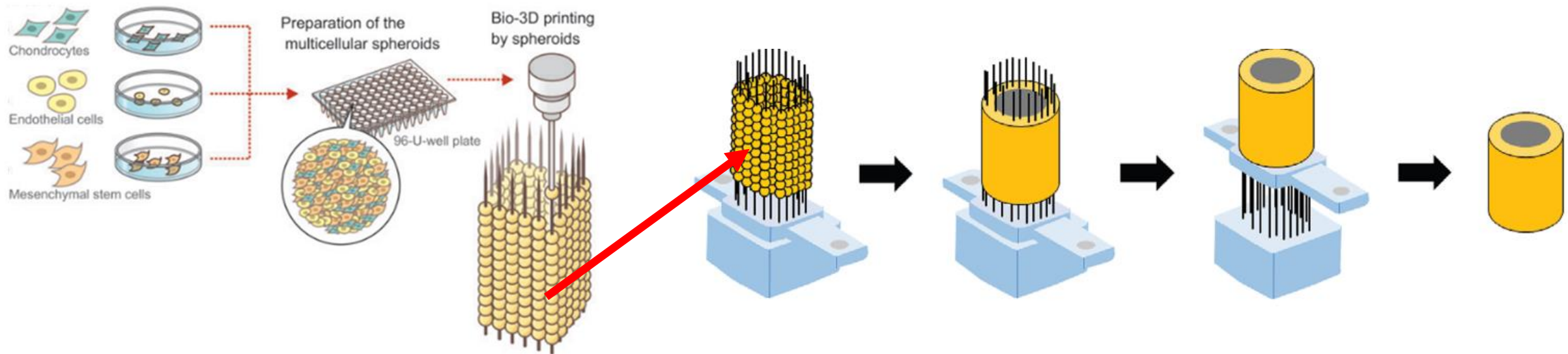
Fabbricazione ed utilizzo di **sferoidi** (diametro $\approx 100 \mu\text{m}$) come unità base per l'ingegneria dei tessuti.



+ Bioassembly: approccio scaffold-free

Metodo Kenzan

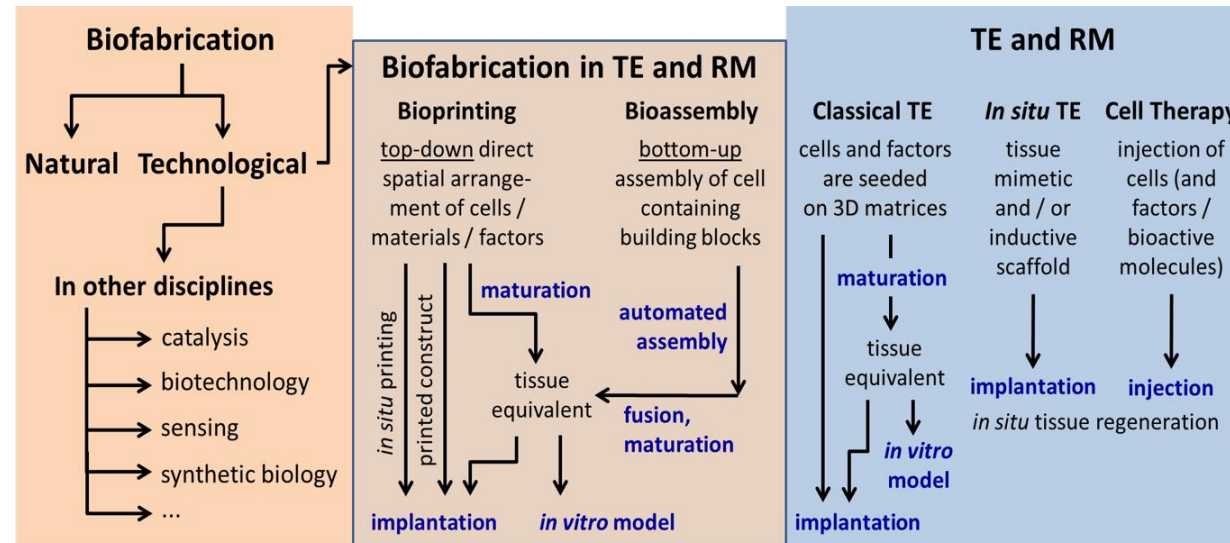
- **Sferoidi** sono raccolti **uno alla volta** e localizzati precisamente in un array di microaghi usando una **braccio robotizzato**.
- Gli sferoidi sono forzati a **toccarsi uno con l'altro**, ciò facilita la **loro fusione** e la **produzione di matrice extracellulare**



- Taniguchi, Daisuke, et al. "Scaffold-free trachea regeneration by tissue engineering with bio-3D printing." *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 26.5 (2018): 745-752.
- Murata, Daiki, et al. "Scaffold-Free Bio-3D Printing Using Spheroids as "Bio-Inks" for Tissue (Re-) Construction and Drug Response Tests." *Advanced Healthcare Materials* (2020): 1901831.

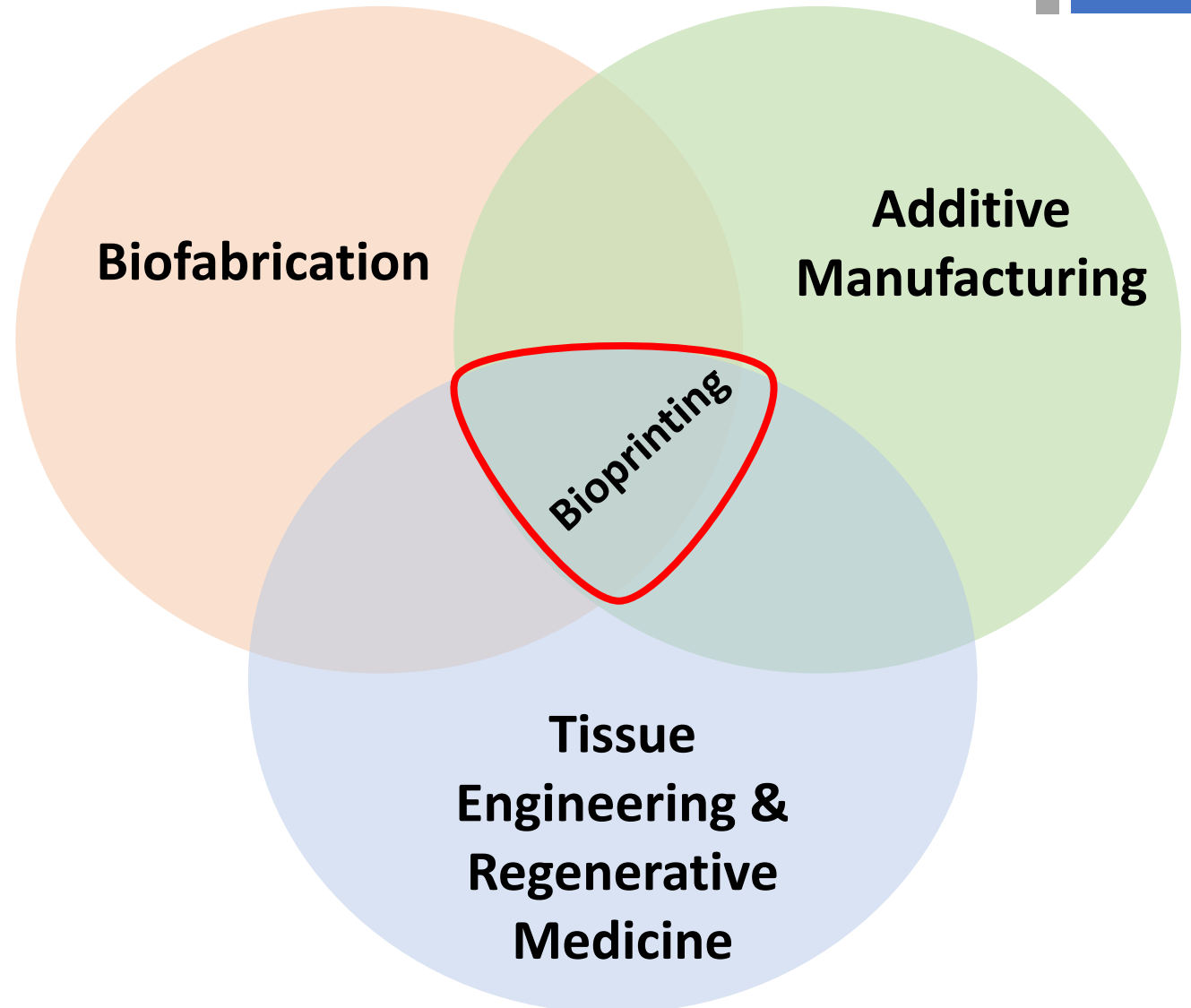
+ Bioprinting

- L'utilizzo di tecniche di **fabbricazione additive** per produrre costrutti bio-ingegnerizzati con una **organizzazione stabilita e precisa**.
- Tali costrutti possono contenere contenenti **materiale vivente e non vivente** e vengono utilizzati nella **medicina rigenerativa**, nella **farmacocinetica** e negli studi di **biologia cellulare**.

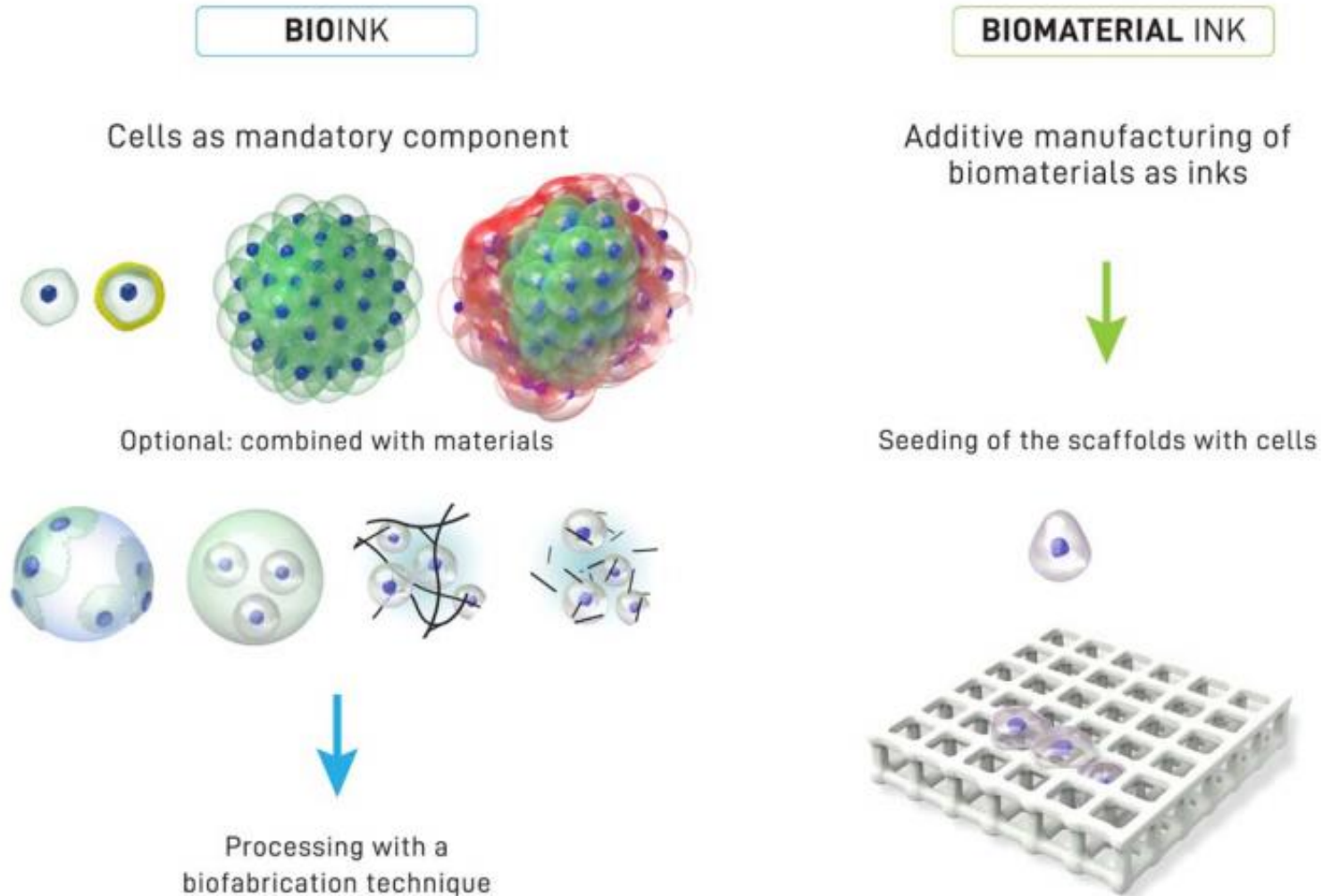


+ Bioprinting

- Fused deposition modelling
- Light-based techniques
 - Stereolithography
 - Two photon polymerization
 - Liquid Induced Transfer Forward
 - Laser sintering
- Technologie inkjet
 - Inkjet 2D
 - Polyjet Technique
 - Binder Jetting (3D printing™)
- Extrusion-based 3D printing
- Electrospinning
- Indirect 3D printing

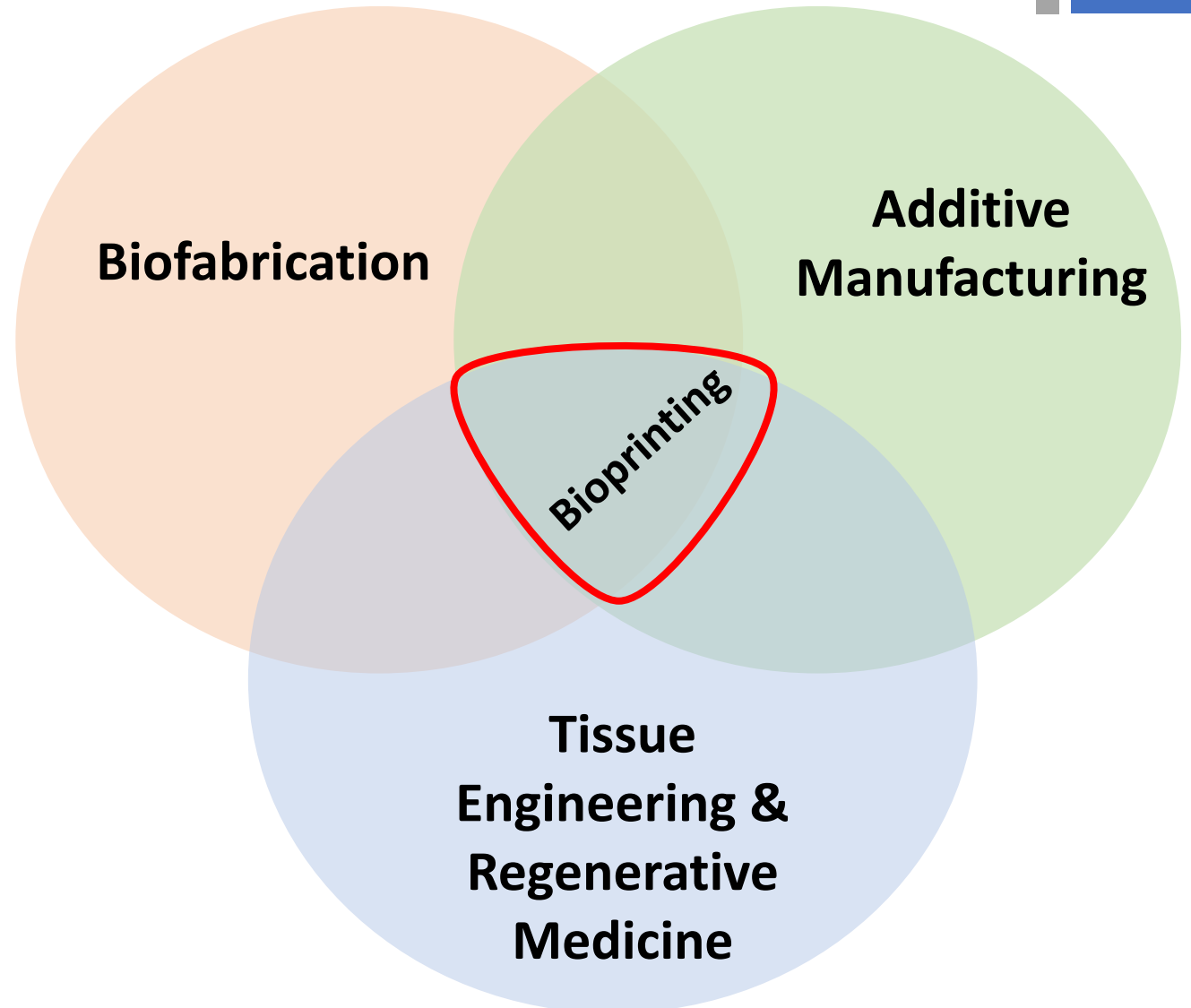


+ Bioink VS Biomaterial Ink



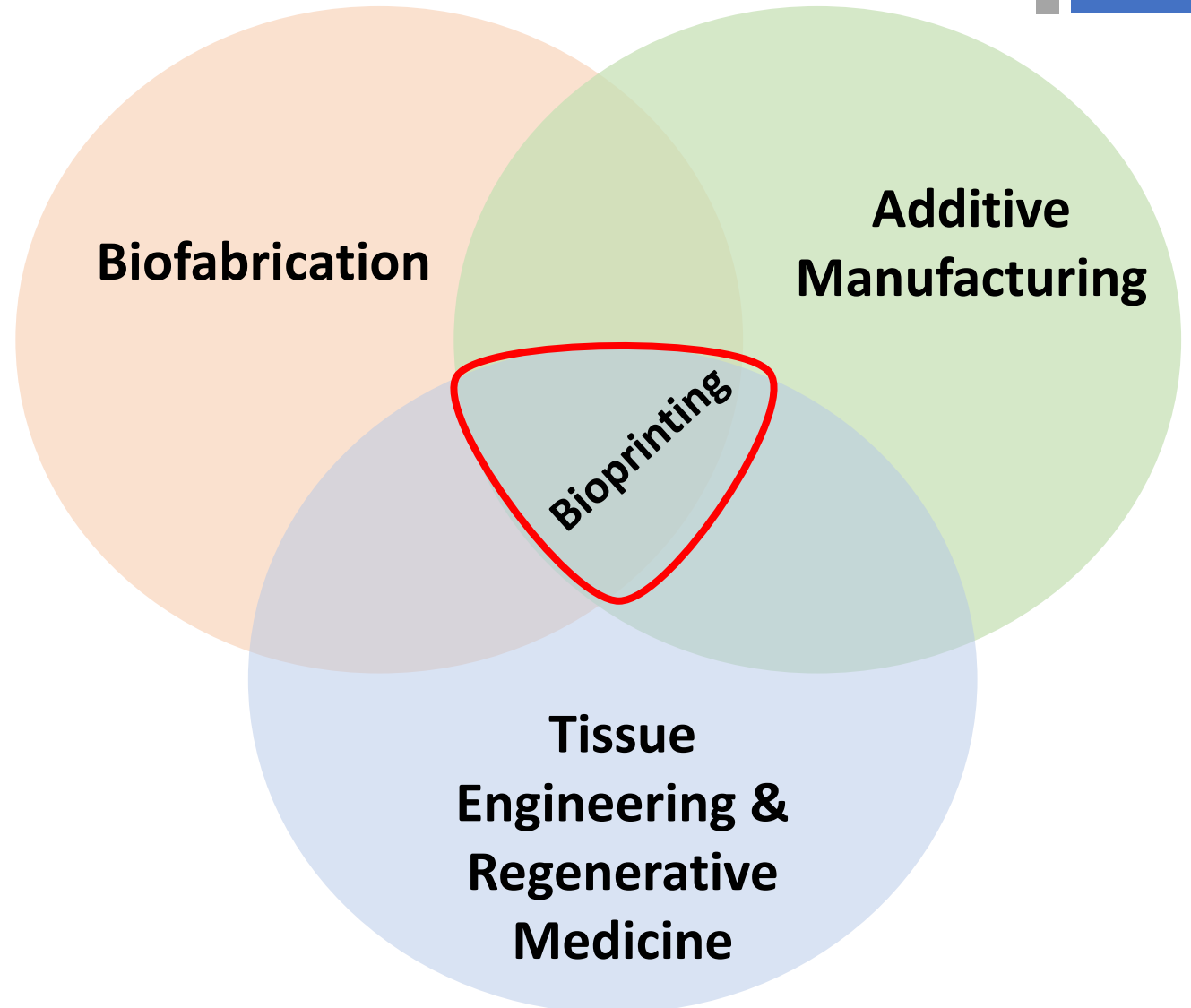
+ Bioprinting

- Fused deposition modelling
- Light-based techniques
 - Stereolithography
 - Two photon polymerization
 - Liquid Induced Transfer Forward
 - Laser sintering
- Technologie inkjet
 - Inkjet 2D
 - Polyjet Technique
 - Binder Jetting (3D printing™)
- Extrusion-based 3D printing
- Electrospinning
- Indirect 3D printing



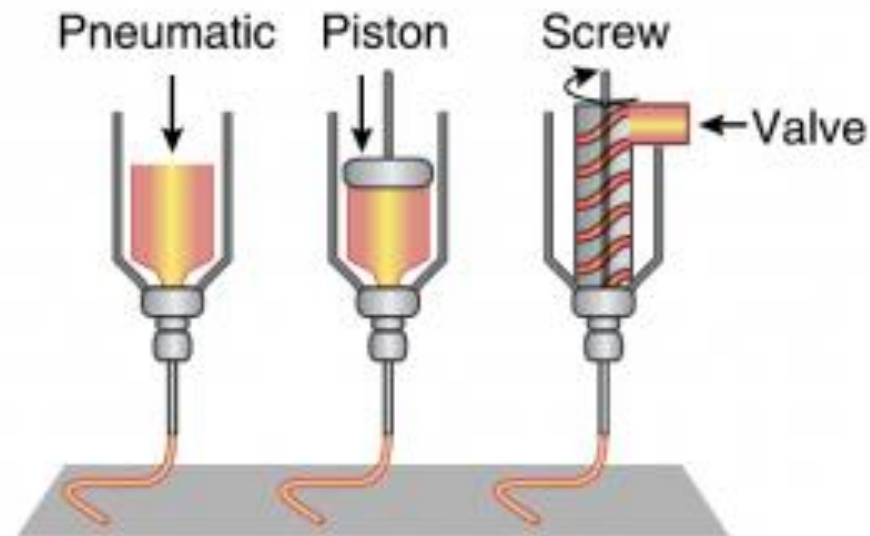
+ Bioprinting

- Fused deposition modelling
- Light-based techniques
 - **Stereolithography**
 - Two photon polymerization
 - **Liquid Induced Transfer Forward**
 - Laser sintering
- Technologie inkjet
 - **Inkjet 2D**
 - Polyjet Technique
 - Binder Jetting (3D printing™)
- **Extrusion-based 3D printing**
- Electrospinning
- **Indirect 3D printing**



+ 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

+ Stampa 3D ad estrusione



È la tecnologia di bioprinting più **efficiente e versatile**, capace di fabbricare scaffold 3D con **dimensioni clinicamente rilevanti** in un **intervallo di tempo relativamente breve**

PROS

- **Ampio range di materiali processabili**, inclusi hydrogels (range di viscosità: 30 mPas – 60 kPas)
- Permette di lavorare a **temperature ambiente** → depositare direttamente cellule
- **Basso costo**

CONS

- Bassa risoluzione
- Frequente Intasamento dell'ago
- Collasso del materiale

+ Proprietà dei biomateriali per la stampa 3D ad estrusione



Un **biomateriale** per essere processato tramite stampa 3D ad estrusione deve possedere **proprietà reologiche**.

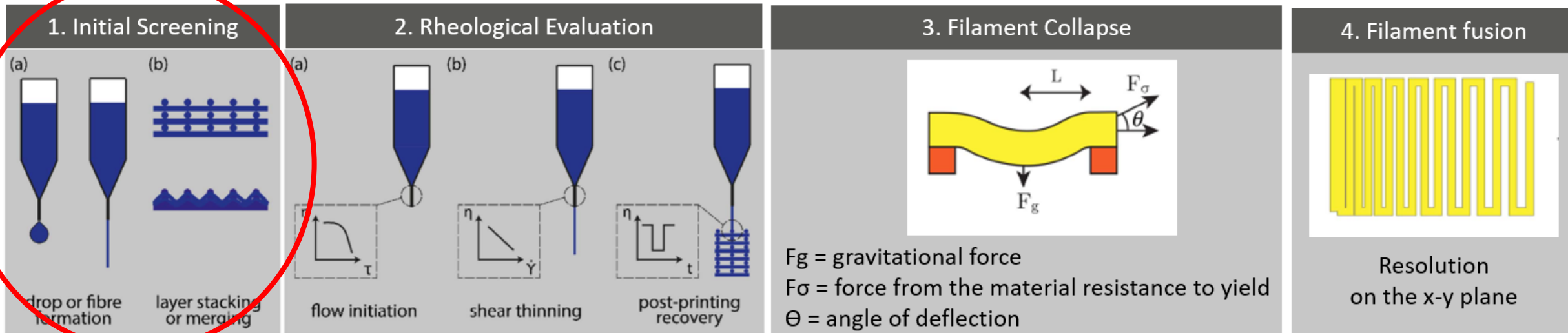
Per poter avere una **buona stampabilità** e una **buona fedeltà di stampa** un biomateriale deve avere:

- **Sforzo di taglio critico**
- **Comportamento pseudoplastico**
- **Elevata viscosità**
- **Veloce cinetica di ripresa**

+ Determinazione della stampabilità di un biomateriale



1. **Manual dispensing:** si valuta manualmente l'abilità del biomateriale di formare fibre piuttosto che gocce
2. **Misure reologiche:** valutazione del grado di shear thinning del materiale, e della presenza di uno sforzo di taglio critico
3. **Filament collapse:** valutare la deformazione e il collasso di una fibra sospesa
4. **Filament fusion:** valutare la risoluzione dei fibre stampate sul piano x-y

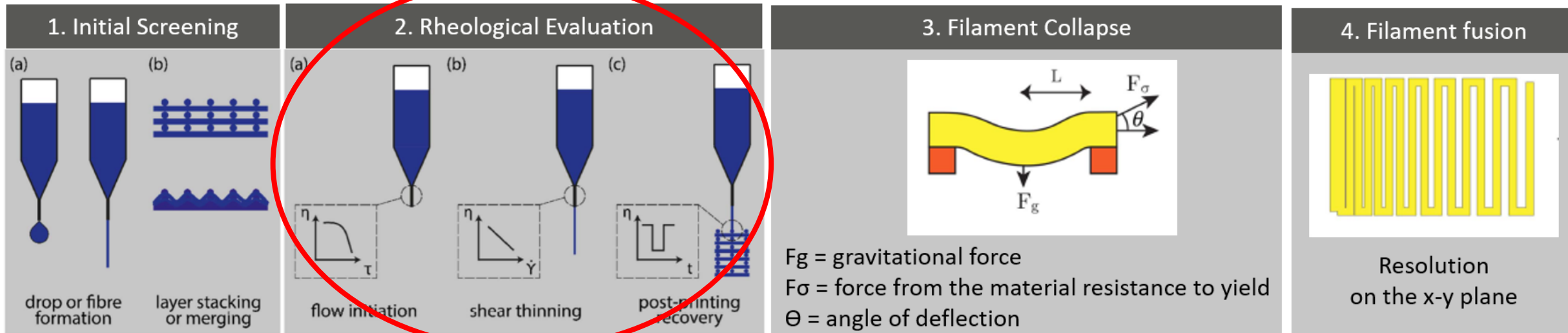


- Paxton, Naomi, et al. "Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability." *Biofabrication* 9.4 (2017): 044107.
- Ribeiro, Alexandre, et al. "Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting." *Biofabrication* 10.1 (2017): 014102

+ Determinazione della stampabilità di un biomateriale



1. **Manual dispensing:** si valuta manualmente l'abilità del biomateriale di formare fibre piuttosto che gocce
2. **Misure reologiche:** valutazione del grado di shear thinning del materiale, e della presenza di uno sforzo di taglio critico
3. **Filament collapse:** valutare la deformazione e il collasso di una fibra sospesa
4. **Filament fusion:** valutare la risoluzione dei fibre stampate sul piano x-y

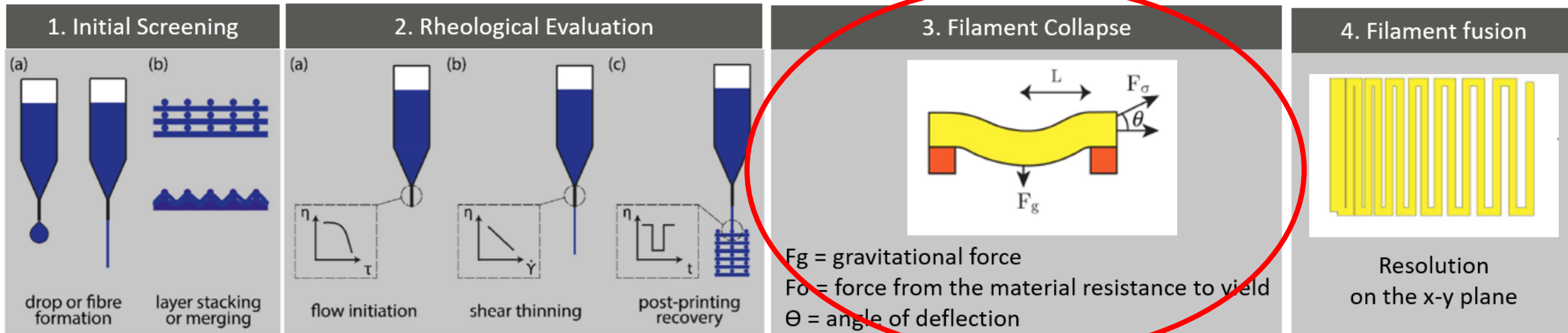


- Paxton, Naomi, et al. "Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability." *Biofabrication* 9.4 (2017): 044107.
- Ribeiro, Alexandre, et al. "Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting." *Biofabrication* 10.1 (2017): 014102

+ Determinazione della stampabilità di un biomateriale



1. **Manual dispensing:** si valuta manualmente l'abilità del biomateriale di formare fibre piuttosto che gocce
2. **Misure reologiche:** valutazione del grado di shear thinning del materiale, e della presenza di uno sforzo di taglio critico
3. **Filament collapse:** valutare la deformazione e il collasso di una fibra sospesa
4. **Filament fusion:** valutare la risoluzione dei fibre stampate sul piano x-y

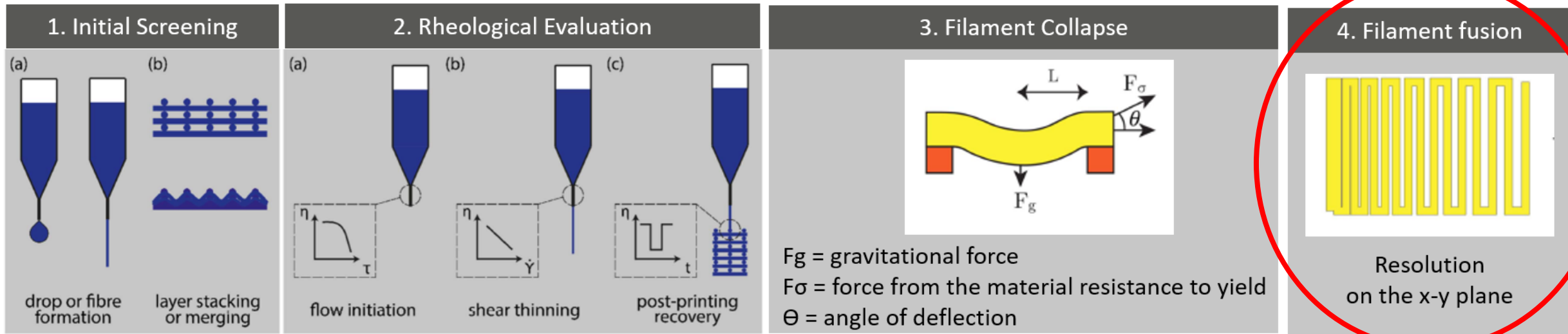


- Paxton, Naomi, et al. "Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability." *Biofabrication* 9.4 (2017): 044107.
- Ribeiro, Alexandre, et al. "Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting." *Biofabrication* 10.1 (2017): 014102

+ Determinazione della stampabilità di un biomateriale



1. **Manual dispensing:** si valuta manualmente l'abilità del biomateriale di formare fibre piuttosto che gocce
2. **Misure reologiche:** valutazione del grado di shear thinning del materiale, e della presenza di uno sforzo di taglio critico
3. **Filament collapse:** valutare la deformazione e il collasso di una fibra sospesa
4. **Filament fusion:** valutare la risoluzione dei fibre stampate sul piano x-y



- Paxton, Naomi, et al. "Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability." *Biofabrication* 9.4 (2017): 044107.
- Ribeiro, Alexandre, et al. "Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting." *Biofabrication* 10.1 (2017): 014102

+ Stampa 3D di materiali soft



Una **grande sfida** nella biofabbricazione è la fabbricazione di scaffold costituiti da **materiali soft**, cioè materiali poco viscosi ma altamente **cell-friendly**.

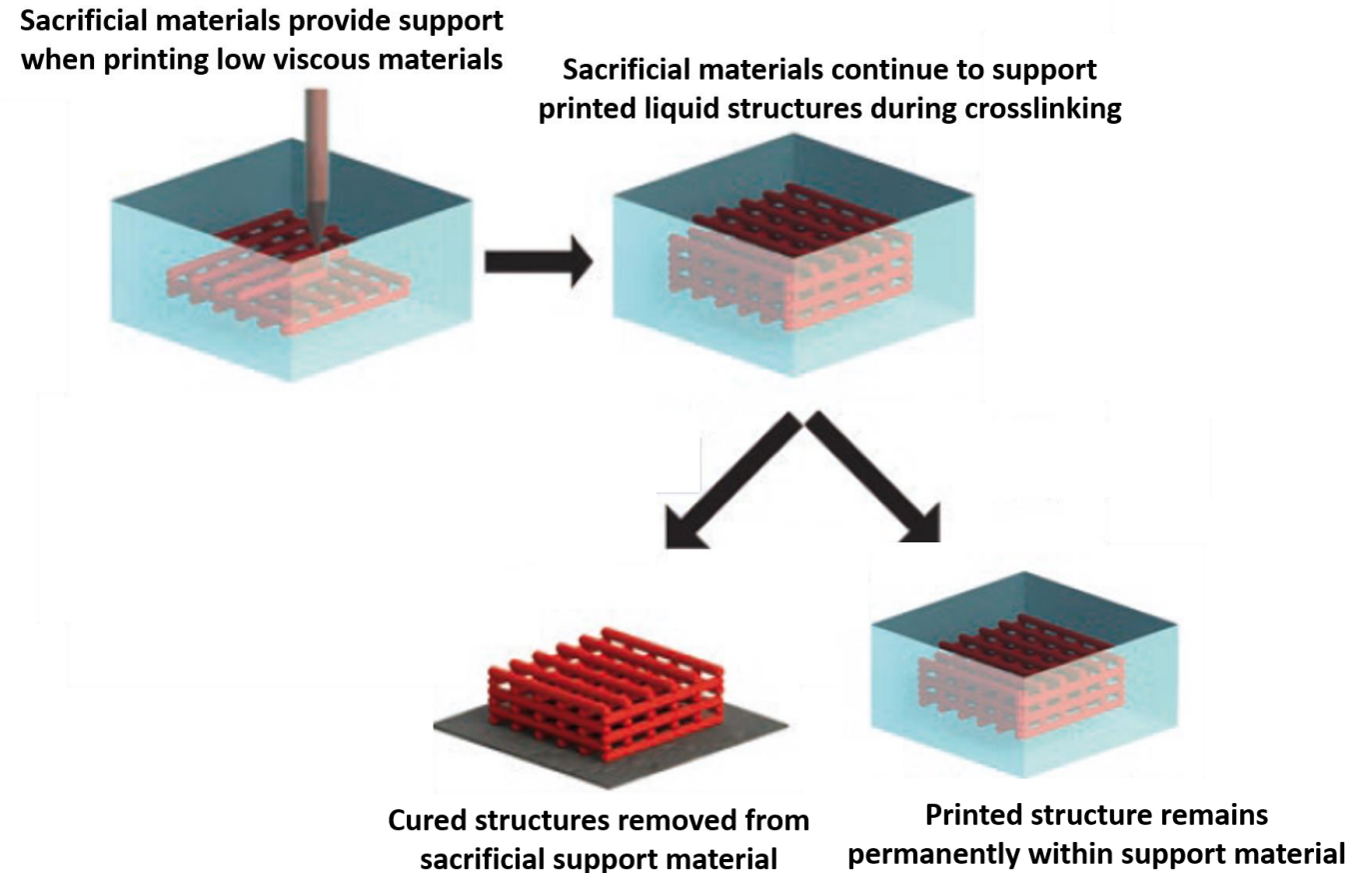
Molti progressi sono stati fatti usando **materiali di supporto sacrificali**, che supportano il costrutto soft durante la fabbricazione senza essere parte del costrutto stesso.

- O'Bryan, Christopher S., et al. "Three-dimensional printing with sacrificial materials for soft matter manufacturing." *MRS bulletin* 42.8 (2017): 571-577.
- Kilian, David, et al. "Three-dimensional bioprinting of volumetric tissues and organs." *MRS Bulletin* 42.8 (2017): 585-592.

+ Stampa 3D di materiali soft

1. Bioplotting

Il **biomateriale** è **estruso** direttamente all'interno di un **materiale di supporto**, che risulta facilmente rimovibile e che presenta un'elevato sforzo di taglio critico.

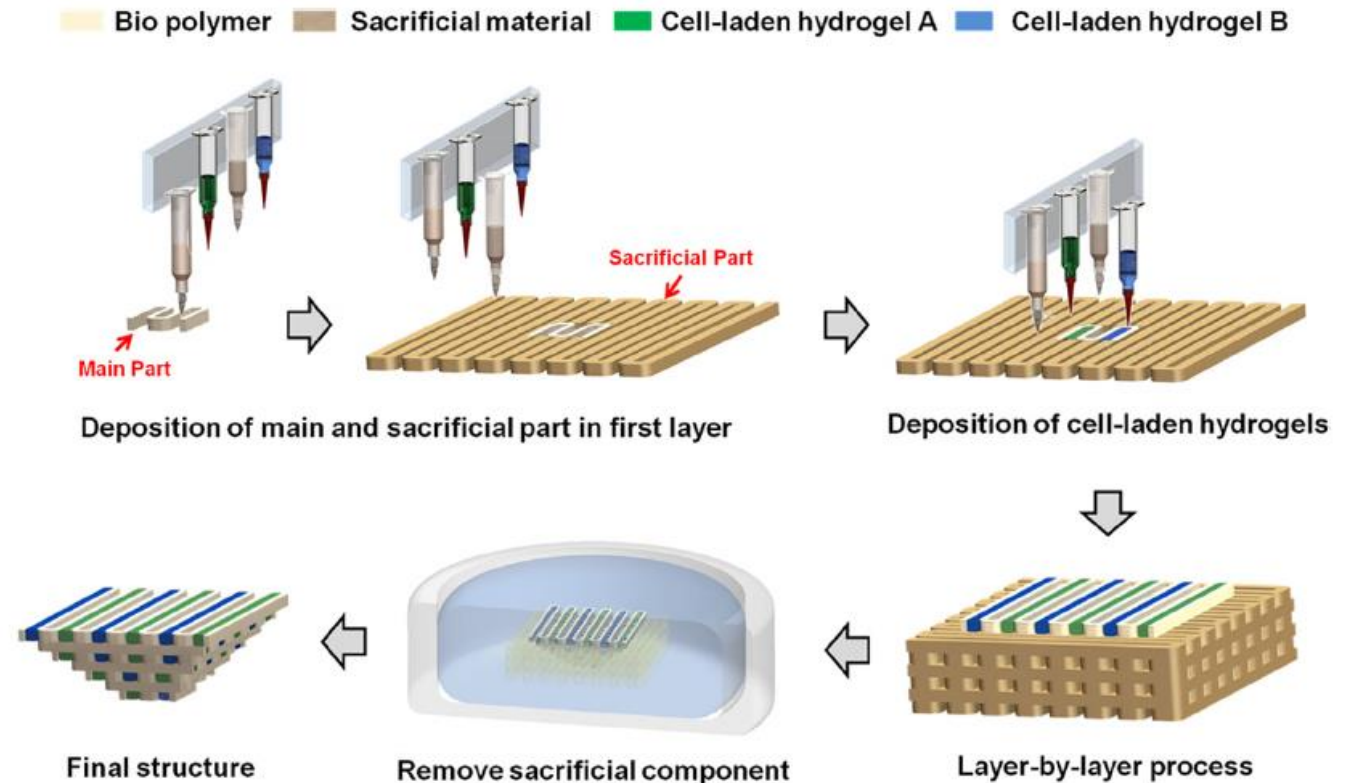


- O'Bryan, Christopher S., et al. "Three-dimensional printing with sacrificial materials for soft matter manufacturing." *MRS bulletin* 42.8 (2017): 571-577.
- T. J. Hinton *et al.*, "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels," *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, 2015.

+ Stampa 3D di materiali soft

2. Stabilizzazione esterna

Stampanti **multi-estrusore** permettono di costruire una struttura a griglia robusta, che agisce da supporto, e di depositare tra una linea e l'altra materiale soft, contenente cellule.



- Pati, F., Shim, J. H., Lee, J. S., & Cho, D. W. (2013). 3D printing of cell-laden constructs for heterogeneous tissue regeneration. *Manufacturing Letters*, 1(1), 49-53.
- Lee, Jung-Seob, et al. "3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration." *Biofabrication* 6.2 (2014): 024103.

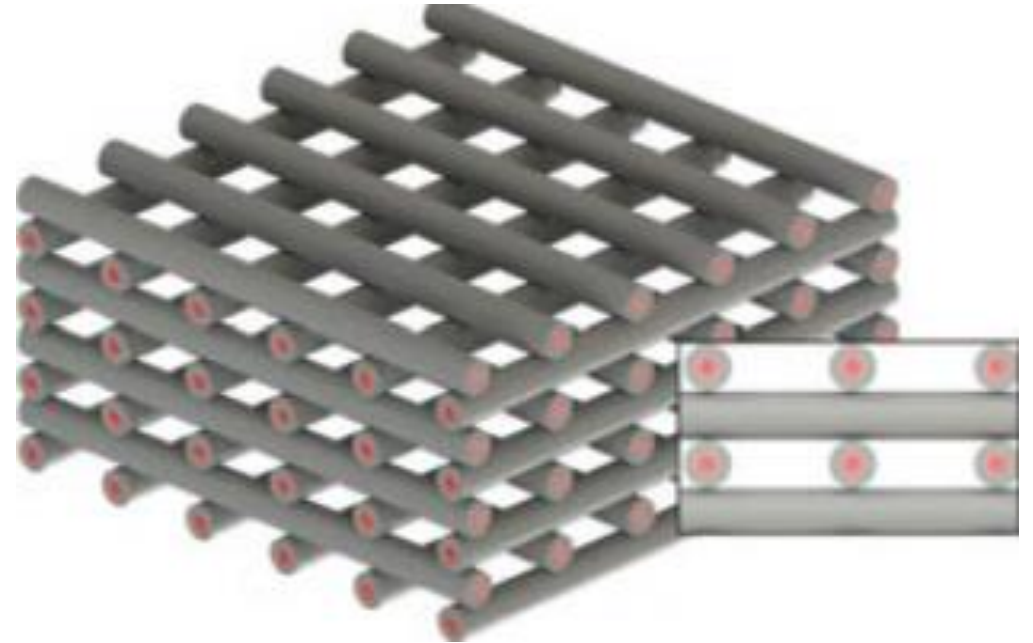
+ Stampa 3D di materiali soft



3. Core shell morphology

Incapsulazione di biomateriali a bassa viscosità all'interno di materiali di supporto ad elevate viscosità attraverso l'uso di **aghi coassiali**.

Questo metodo permette di **regolare finemente le proprietà** finali della struttura.



- Akkineni, Ashwini Rahul, et al. "A versatile method for combining different biopolymers in a core/shell fashion by 3D plotting to achieve mechanically robust constructs." *Biofabrication* 8.4 (2016): 045001.
- Kilian, David, et al. "Three-dimensional bioprinting of volumetric tissues and organs." *MRS Bulletin* 42.8 (2017): 585-592.

+ Stampa 3D di materiali soft



Un materiale sacrificale dovrebbe:

- Avere un elevato sforzo di taglio critico
- Avere un comportamento pseudoplastico
- Avere proprietà reologiche indipendenti dal tempo
- Essere biocompatibile
- Non reagire con il materiale di interesse
- Essere facilmente rimuovibile



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

