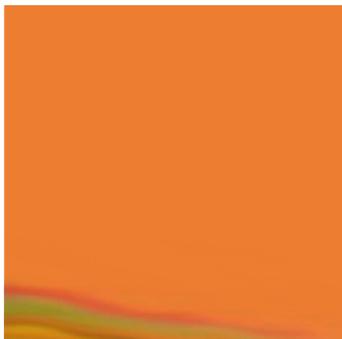
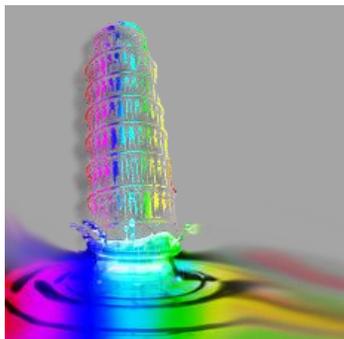




Centro E. Piaggio  
bioengineering and robotics research center

# Stampa 3D e biofabbricazione in ambito biomedicale

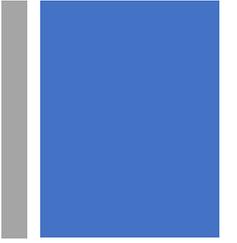


---

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

[irene.chiesa@phd.unipi.it](mailto:irene.chiesa@phd.unipi.it)

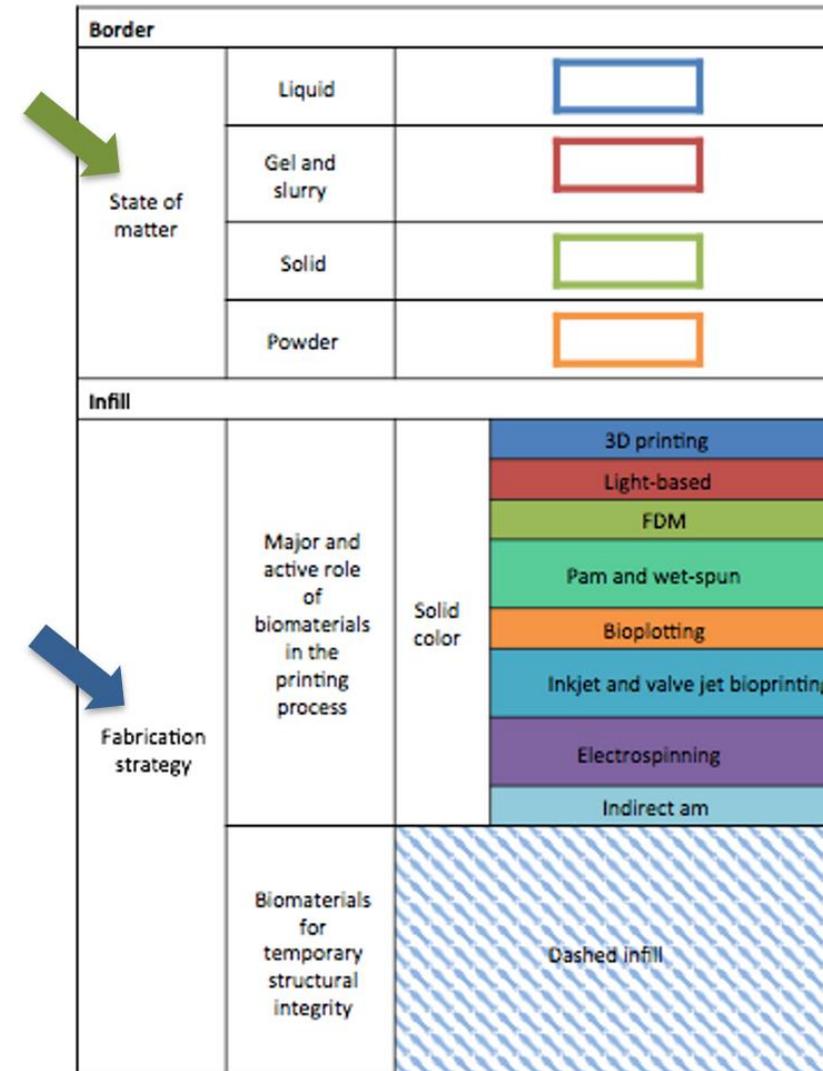
# + Outline



- 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

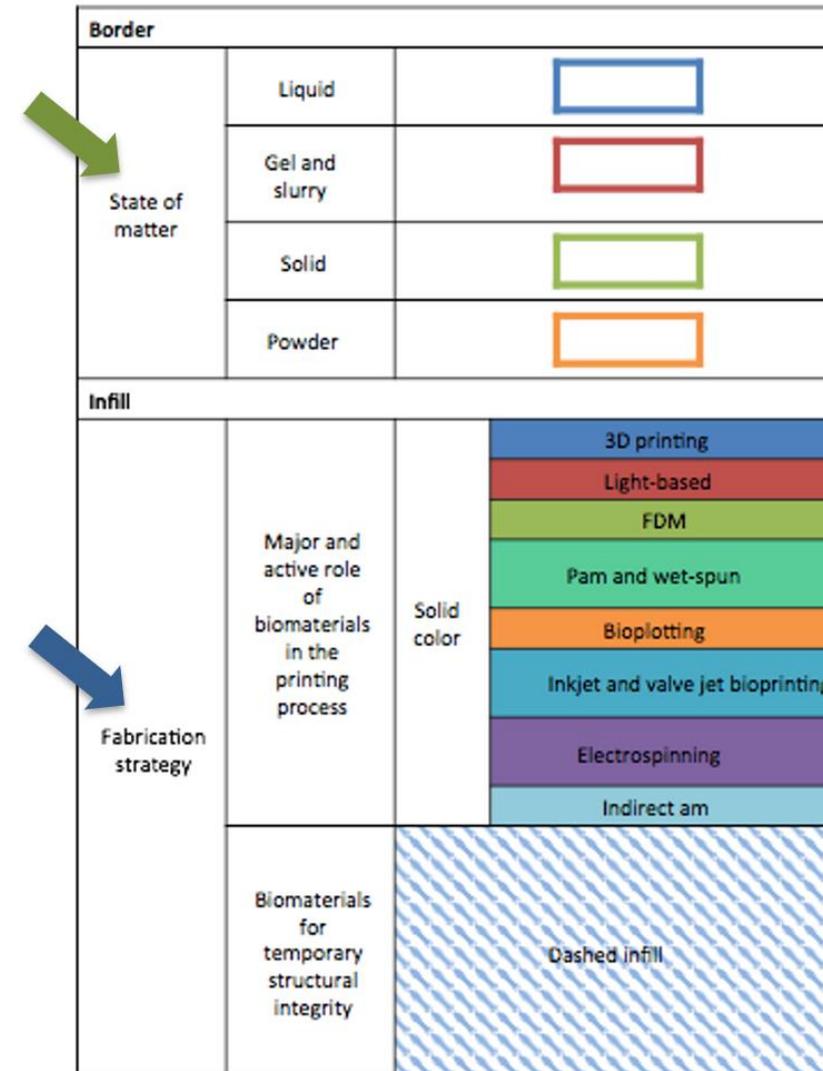
# + Tecnologie di stampa 3D

- 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



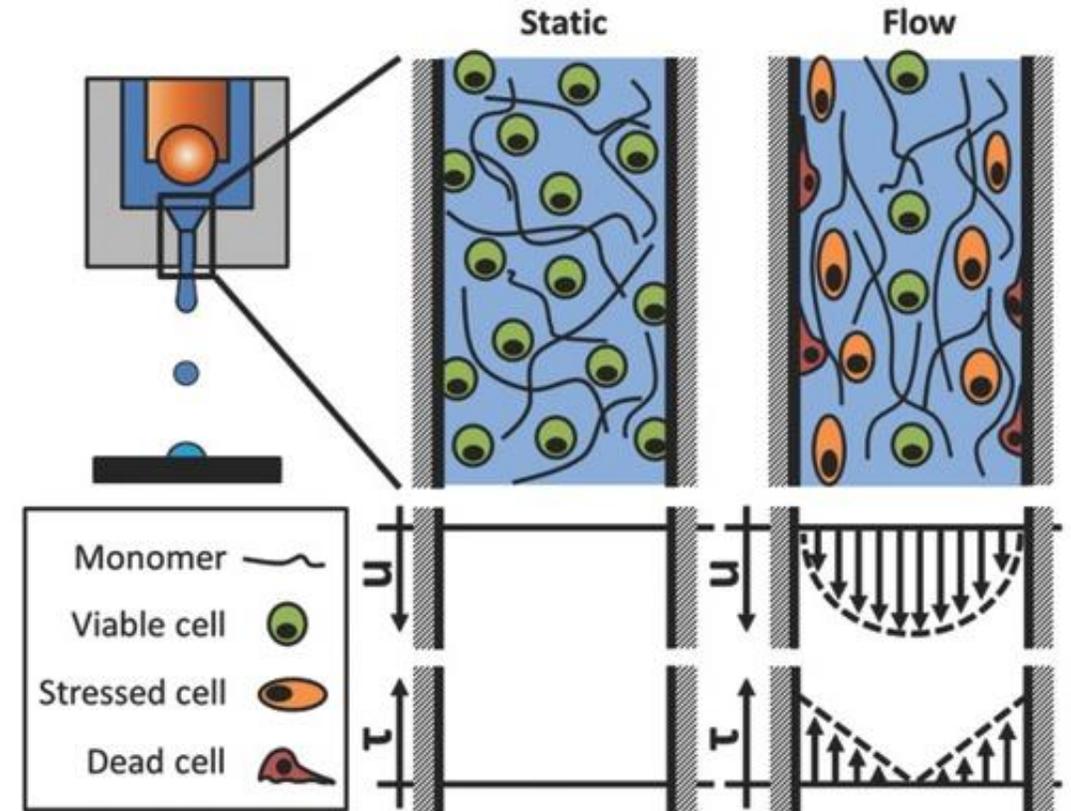
# + Tecnologie di stampa 3D

- 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**



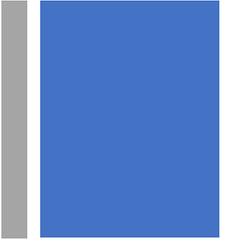
# + Stampa di materiale biologico

- 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



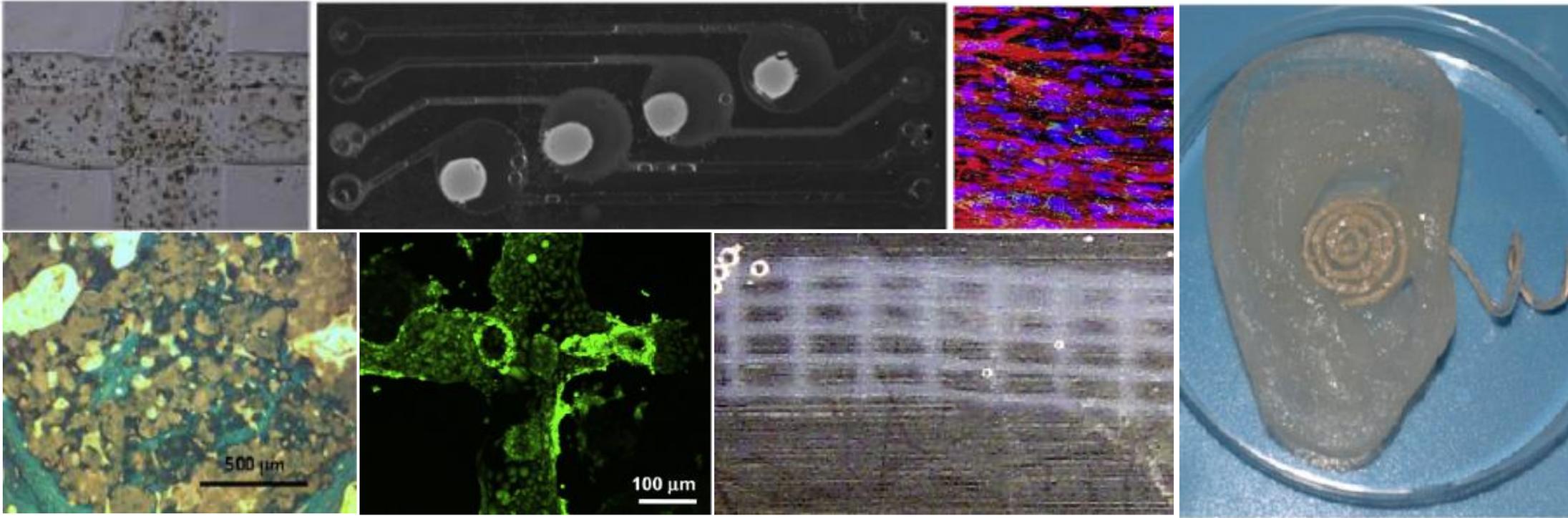
La stampa ad estrusione può lavorare a **temperature ambiente o a 37°C** e non utilizza **solventi tossici**. Di conseguenza se viene scelto **un appropriato biomateriale**, le **cellule** possono essere risospese all'interno del biomateriale prima della stampa e **possono essere depositate insieme al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



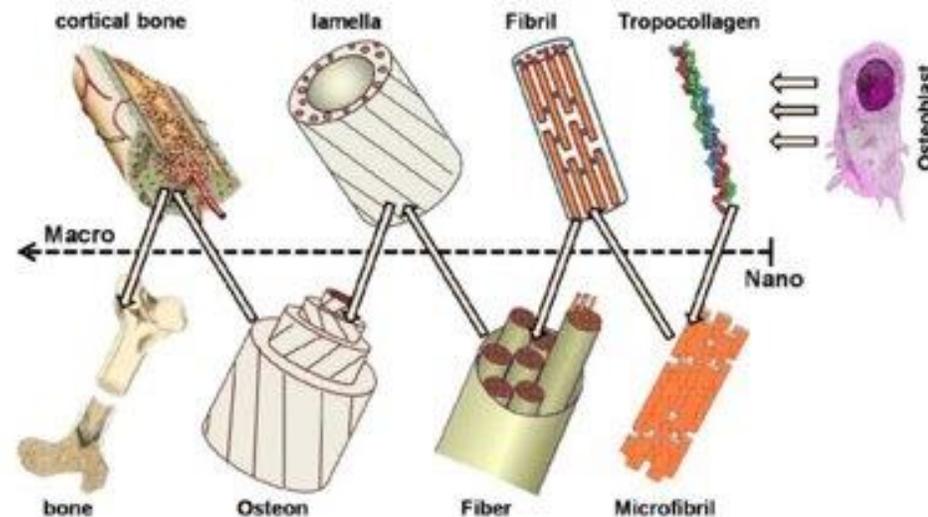
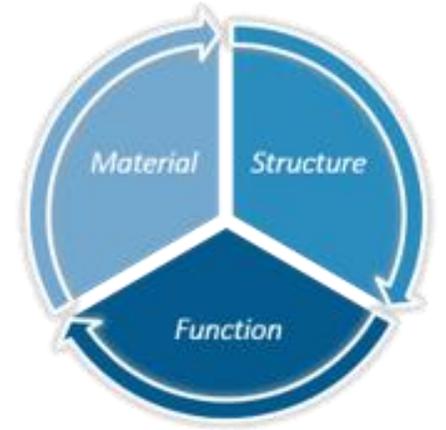
# Nuovi trend nel bioprinting

- 3D bioprinting multiscale
  - In situ bioprinting

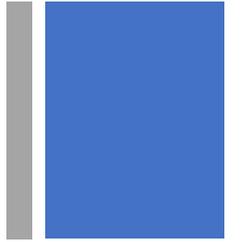
# + 3D Bioprinting multiscala e multimateriale

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**

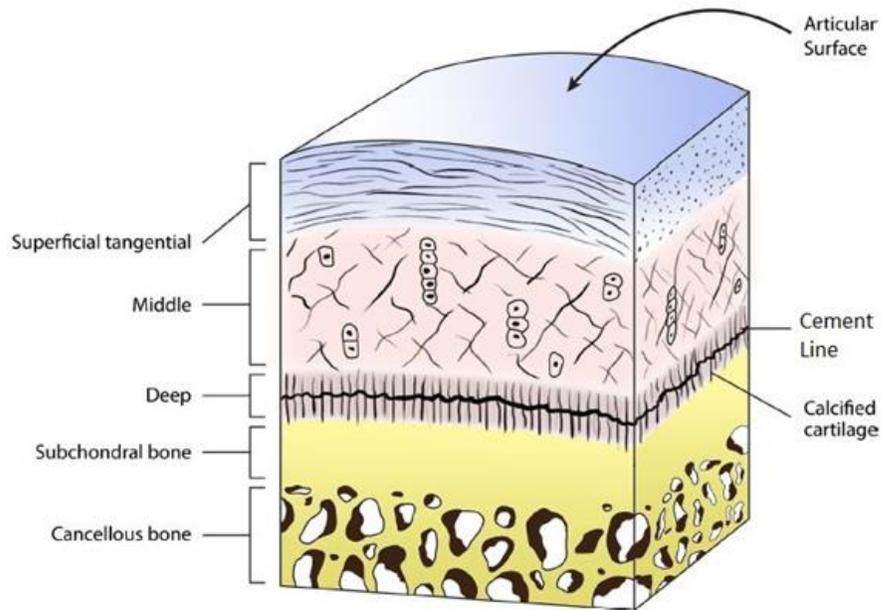


# + 3D Bioprinting multiscala e multimateriale

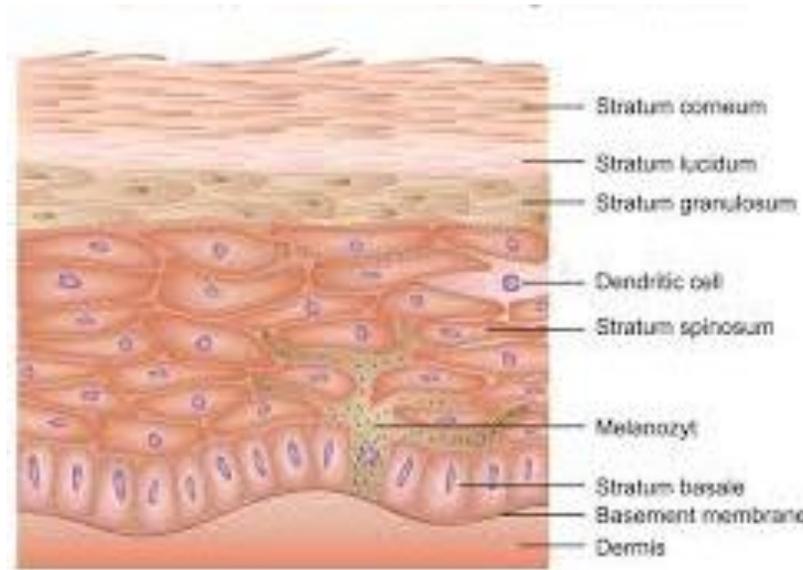


## Fabbricazione di scaffold funzionalmente graduate.

**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

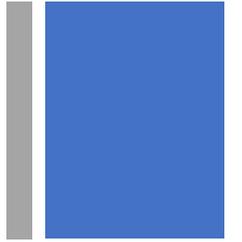


Multiphasic FGS



Continuous FGS

# + 3D Bioprinting multiscala e multimateriale



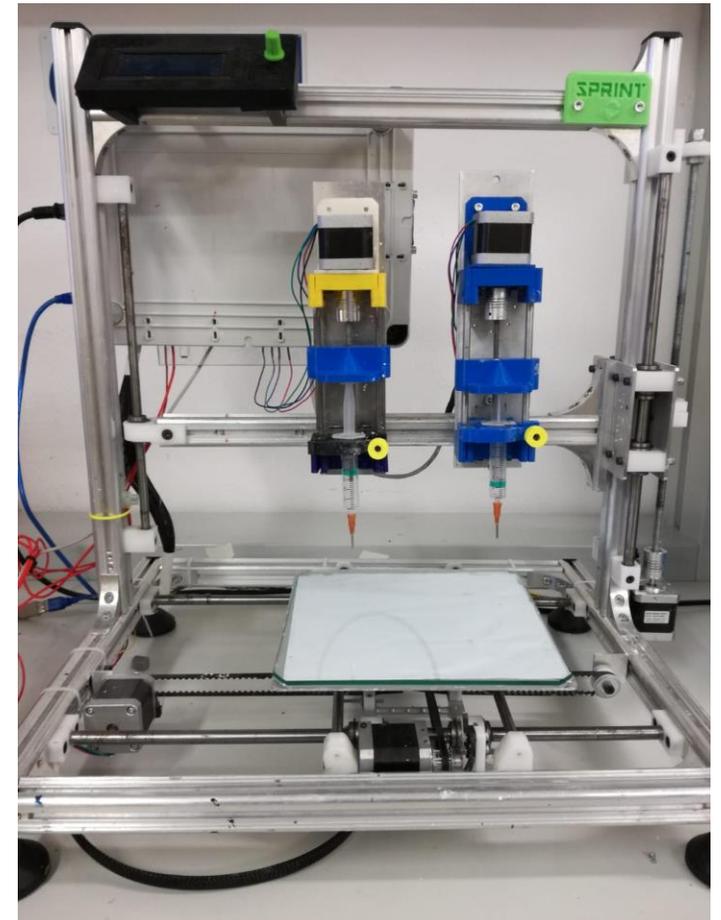
Nelle **stampanti 3D ad estrusione**, spesso è possibile avere **due o più estrusori**.

Vantaggi:

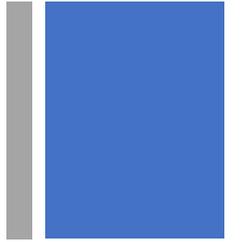
- Utilizzo di un materiale come supporto
- Fabbricazione di strutture graduate
- ....

Svantaggi:

- Calibrazione
- Maggior costo
- ....



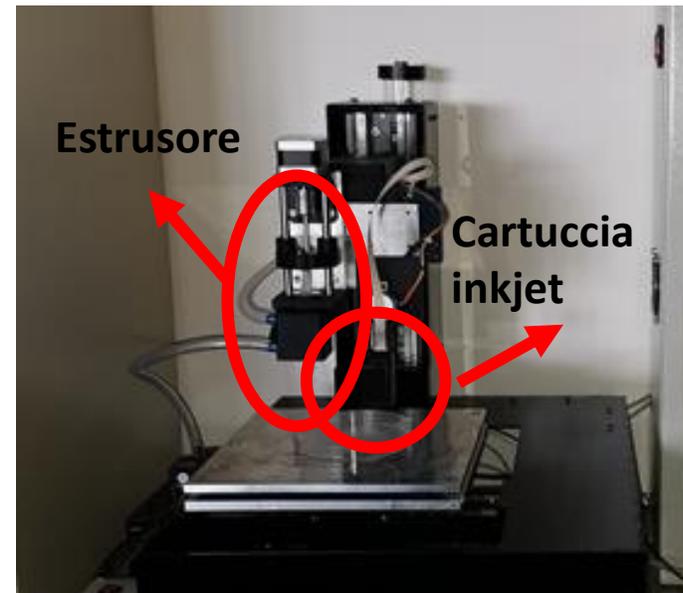
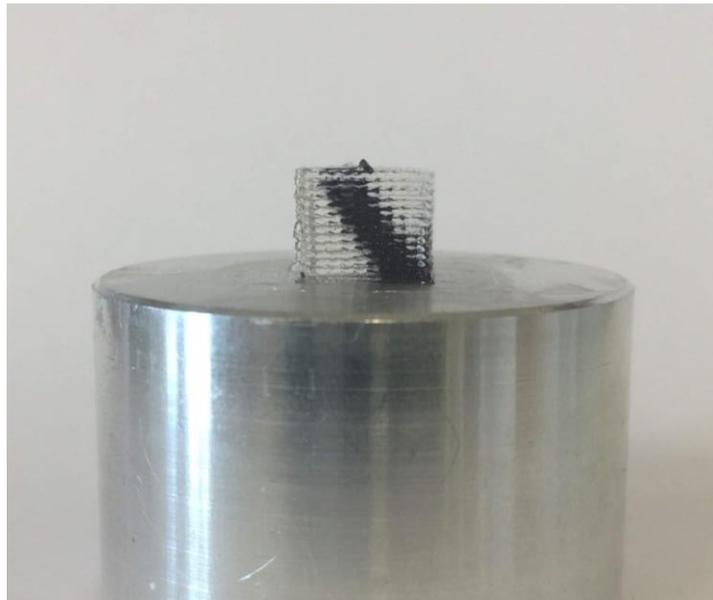
# + 3D Bioprinting multiscala e multimateriale



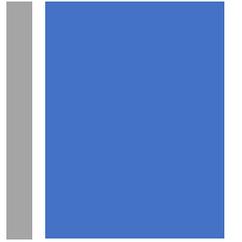
## Tecnologie ibride

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

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



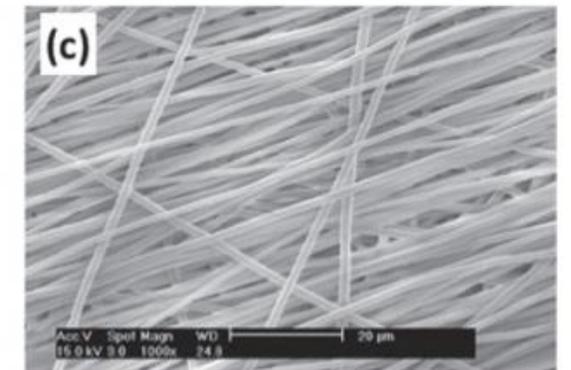
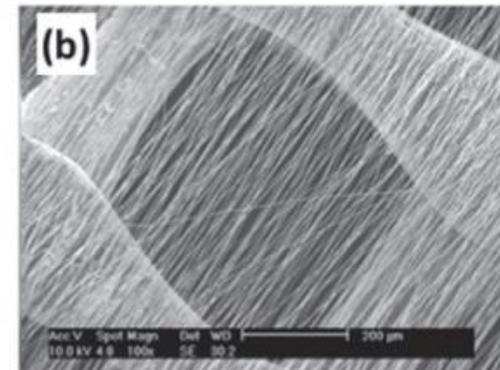
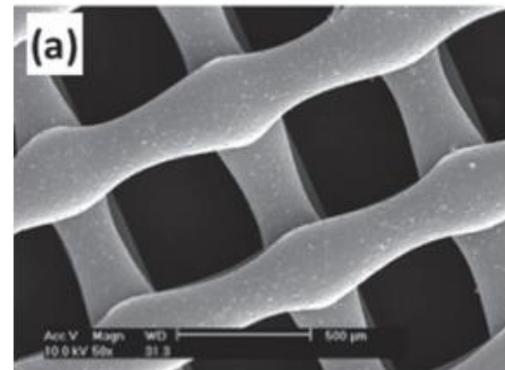
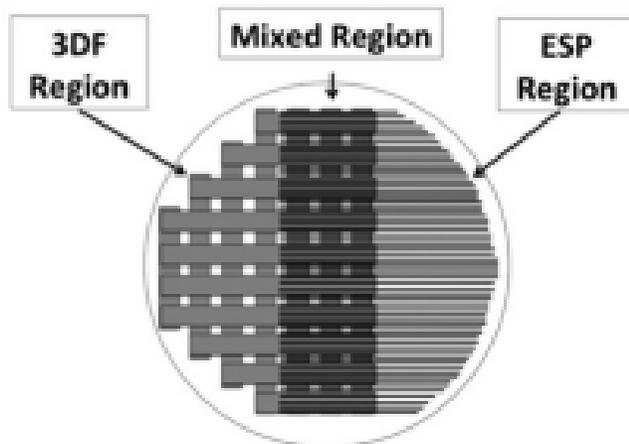
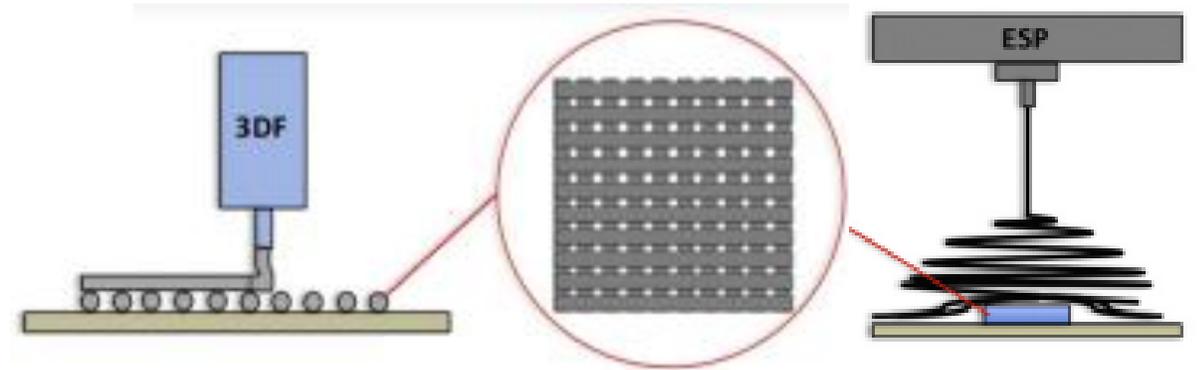
# + 3D Bioprinting multiscala e multimateriale



## 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

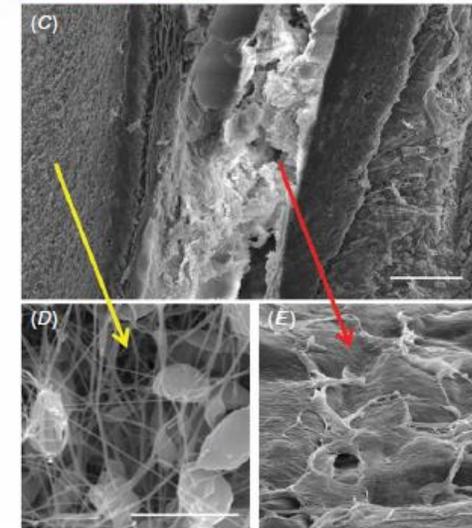
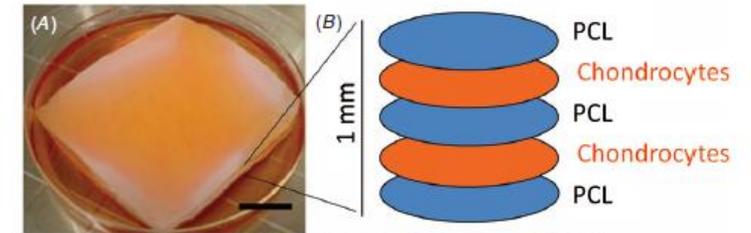
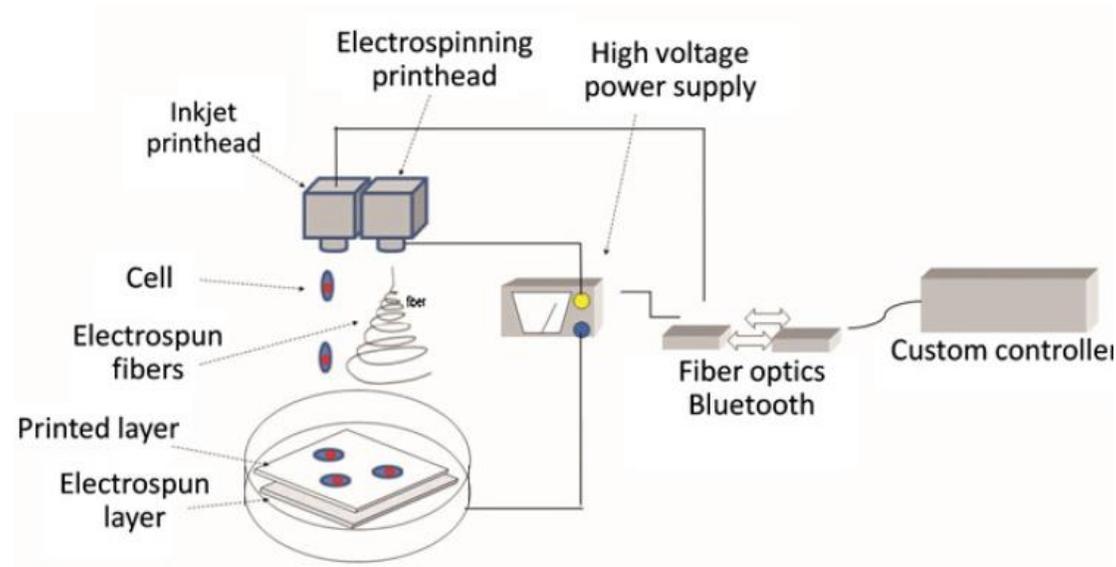


# + 3D Bioprinting multiscala e multimateriale

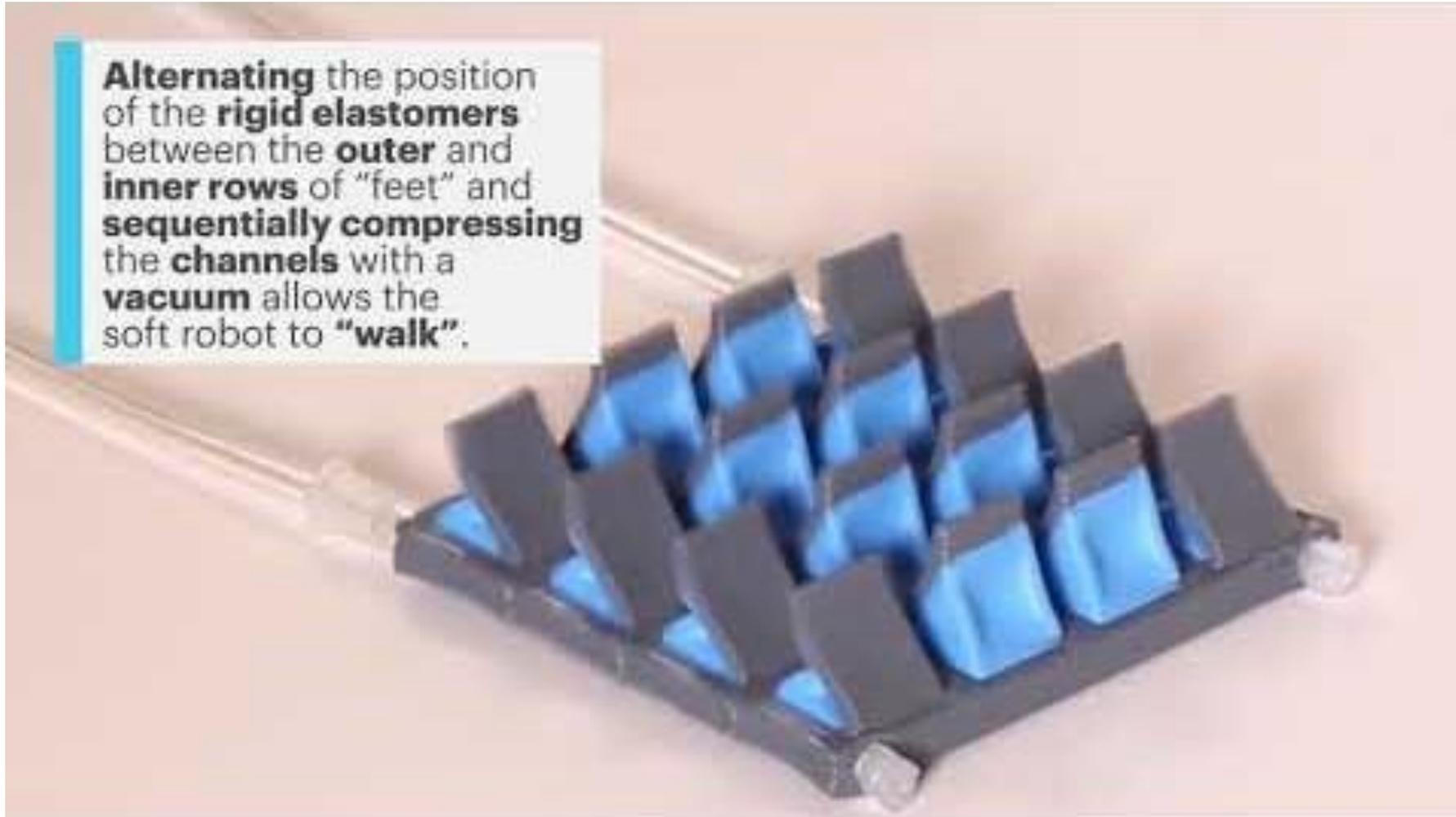
## Tecnologie ibride

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

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

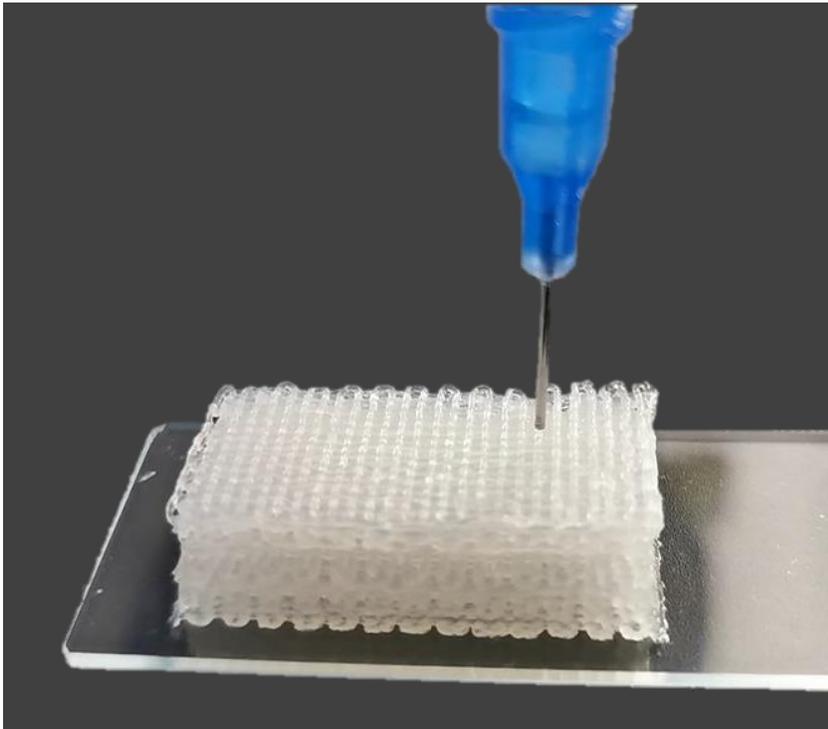


## + 3D Bioprinting multiscala e multimateriae

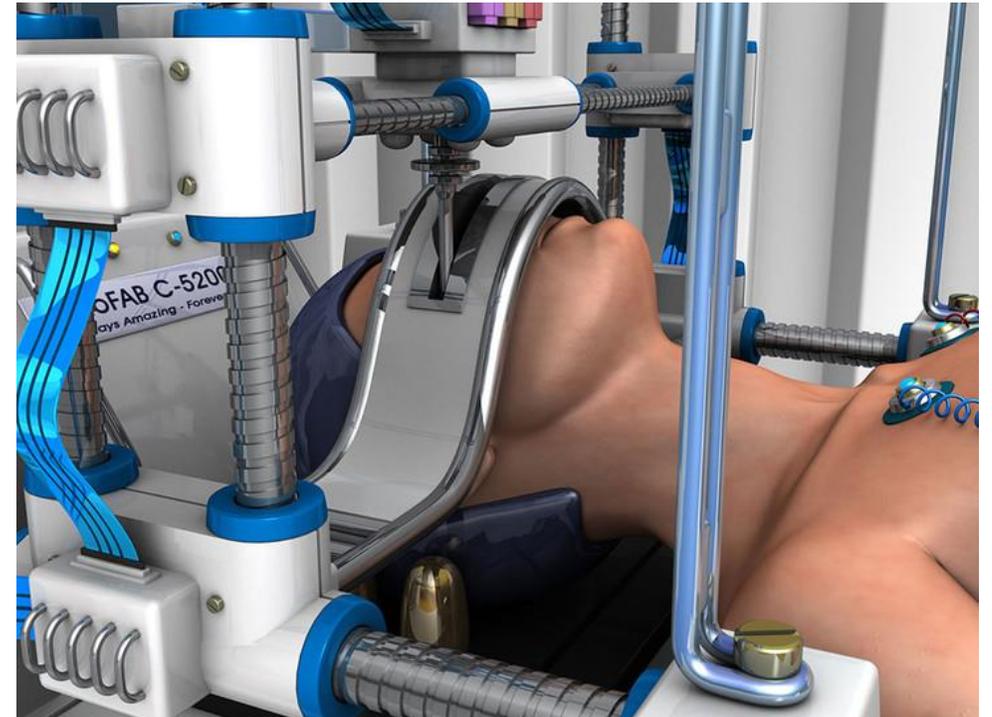


## + In situ bioprinting

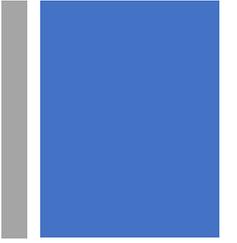
***In vitro* bioprinting (ingegneria dei tessuti scaffold-based):** fabbricazione di scaffold con tecniche di bioprinting.



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



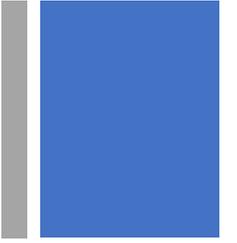
# + In situ bioprinting



## 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

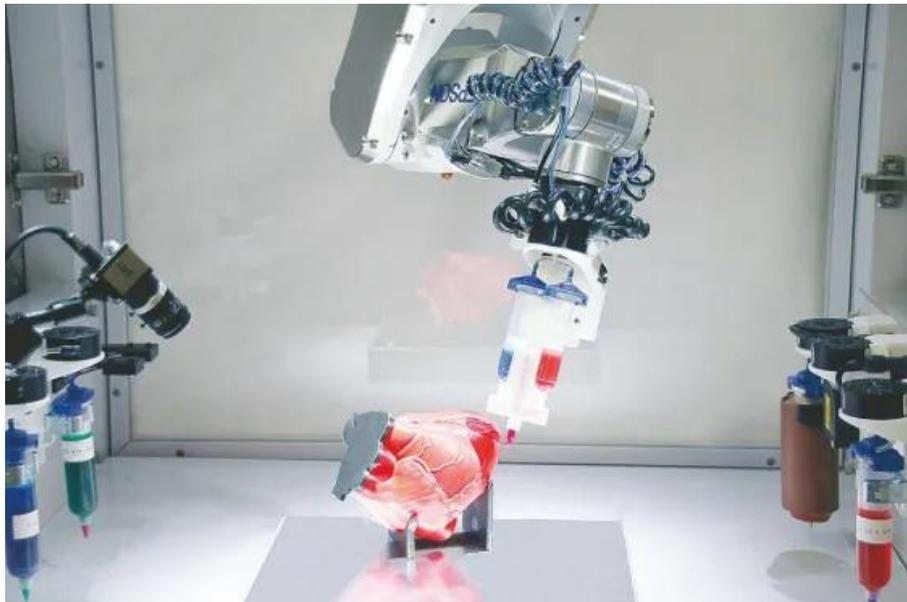
## **CONS:**

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

# + In situ bioprinting

## Bracci robotici

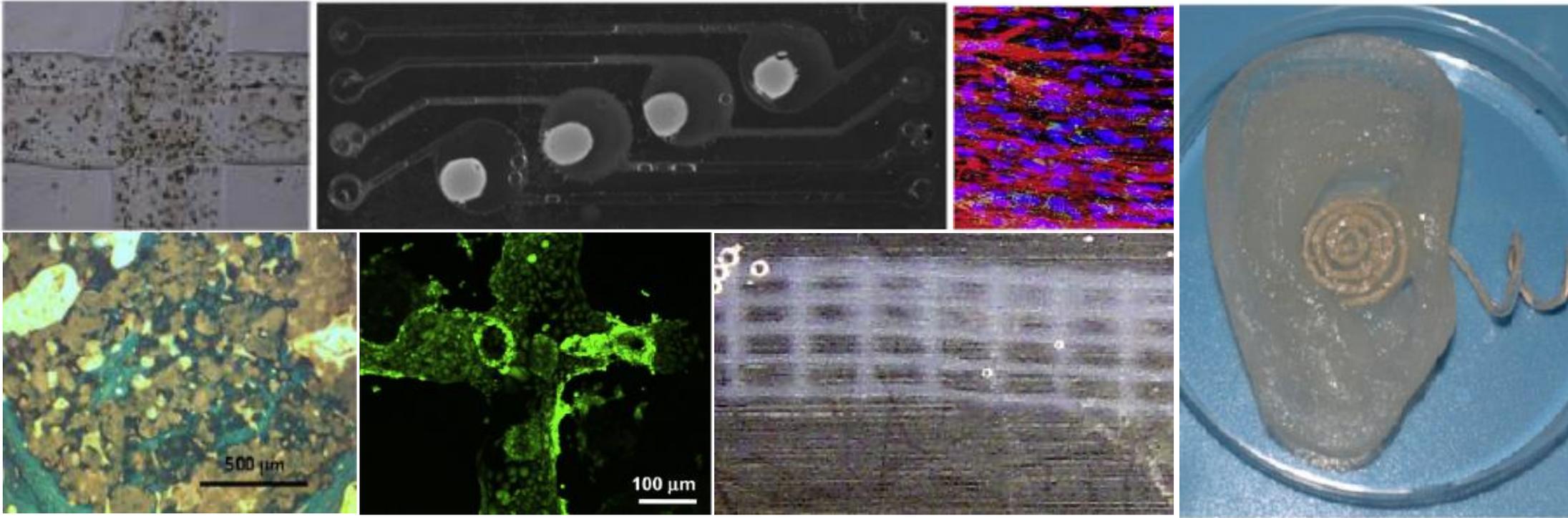
- Bracci robotici ad n-gradi di libertà dotati di un sistema di estrusione
- Possibilità di costruire traiettorie di stampa attraverso software CAD/CAM



## 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*

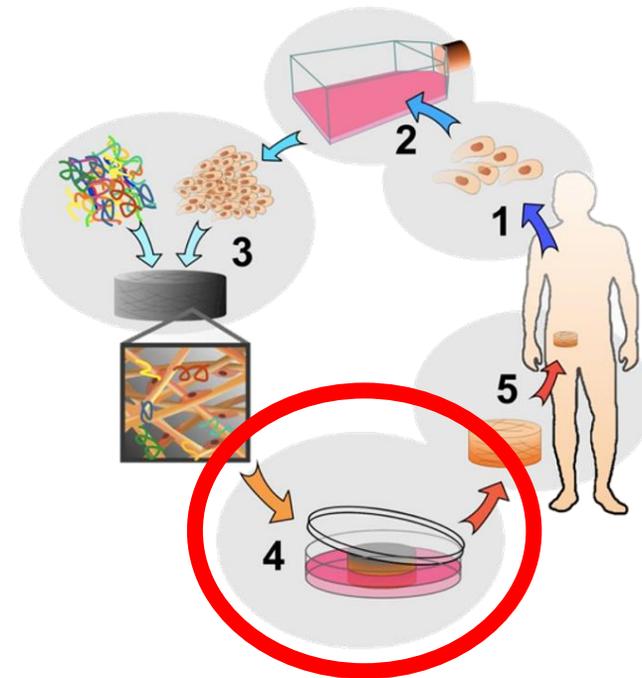
# + Tipologie di coltura

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

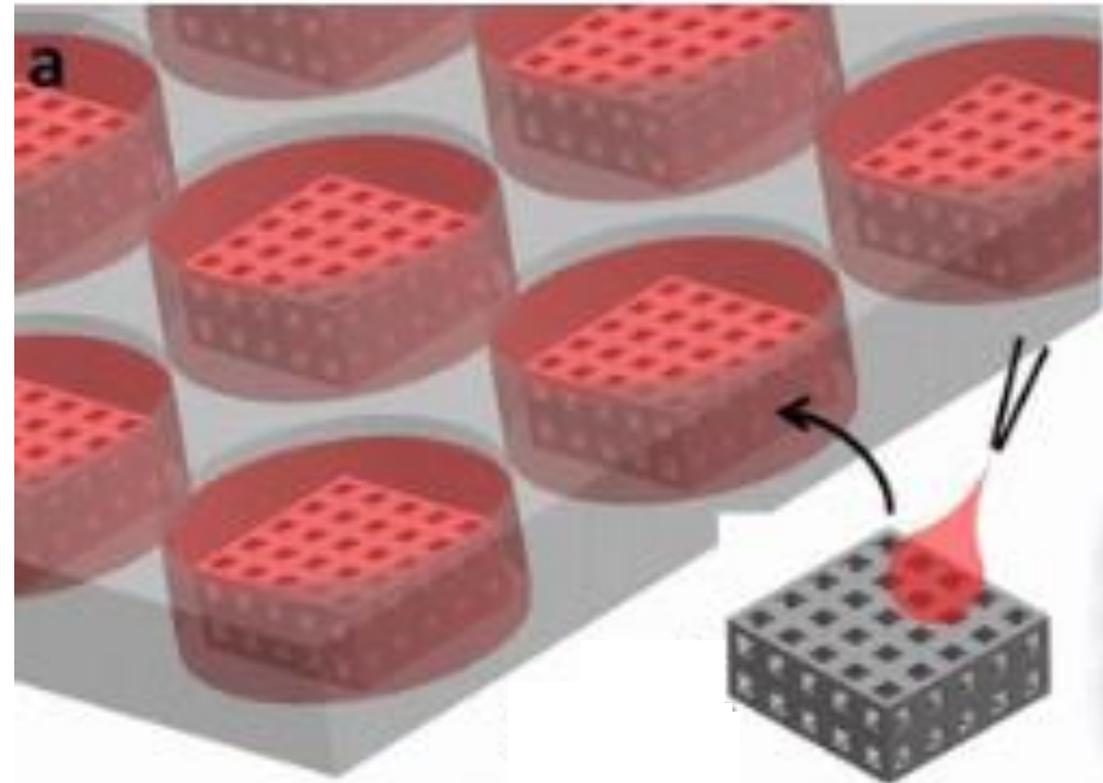
Il costrutto (scaffold + cellule) viene inserito all'interno di **piastre di Petri o Piastre multipozzetto**. Le piastre vengono poi riempite con **mezzo di coltura** contenente nutrienti e **fattori di crescita**. Le piastre vengono poi poste e mantenute all'interno di un **incubatore** ( $T=37^{\circ}\text{C}$ , ambiente umido e  $\text{CO}_2$  al 5%). È necessario cambiare il mezzo ogni 2-3 giorni



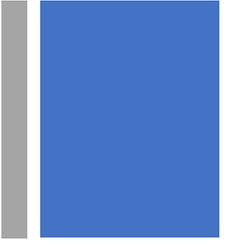
Piastre multipozzetto



Piastre di Petri



## + Tipologie di coltura: coltura statica



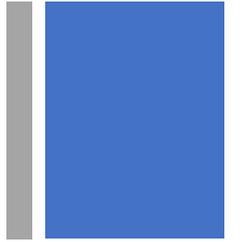
### **Vantaggi:**

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

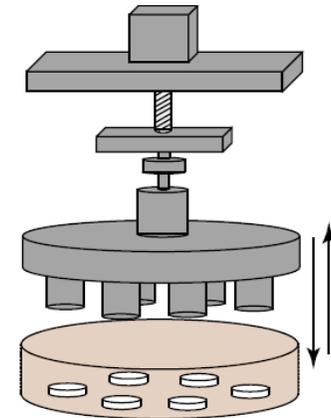
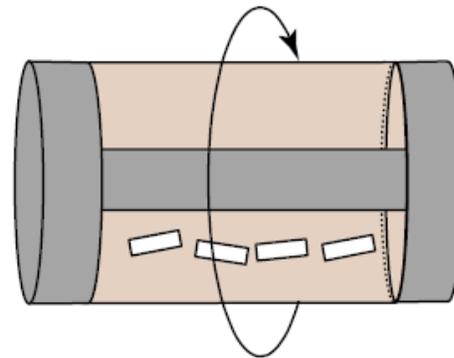
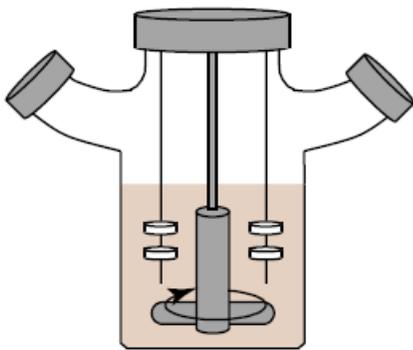
### **Svantaggi:**

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

## + Tipologie di coltura: coltura dinamica



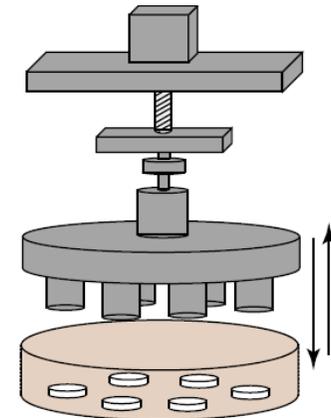
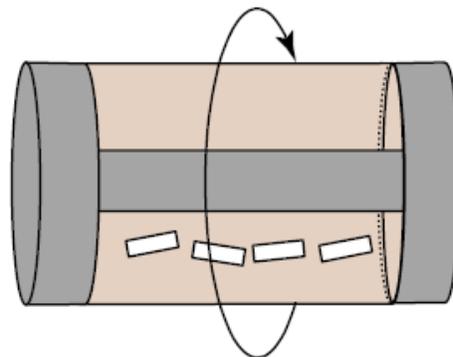
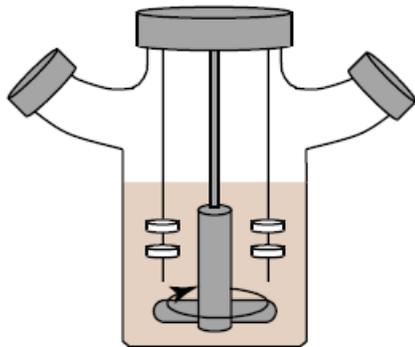
- Sistemi di coltura dinamica utilizzano i **bioreattori**: dispositivi **sterili** all'interno dei quali viene coltivato il costrutto e che promuovono la crescita del tessuto artificiale in **condizioni dinamiche altamente controllabili**.
- I **bioreattori** sono dei “**simulatori di organismi viventi**”,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



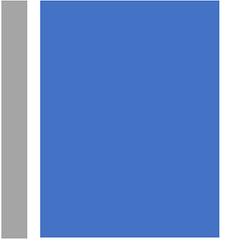
# + Tipologie di coltura: coltura dinamica

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 O<sub>2</sub>, sforzi di taglio) dotando i bioreattori di appositi sensori
- È possibile coltivare **tipi cellulari diversi** con **mezzi di coltura diversi**

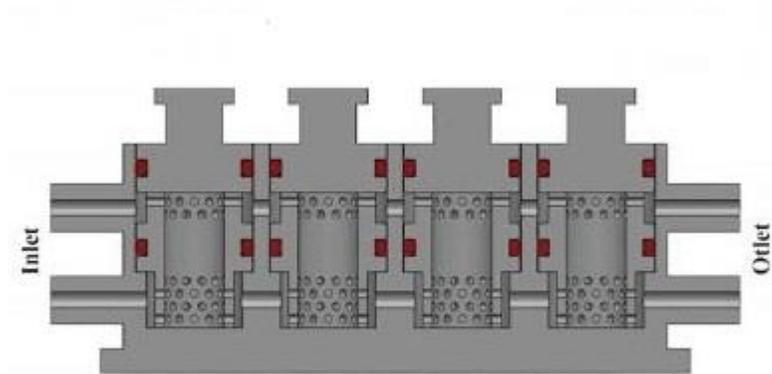
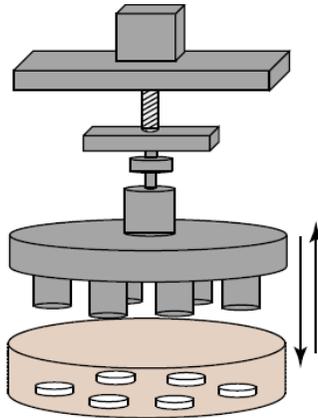
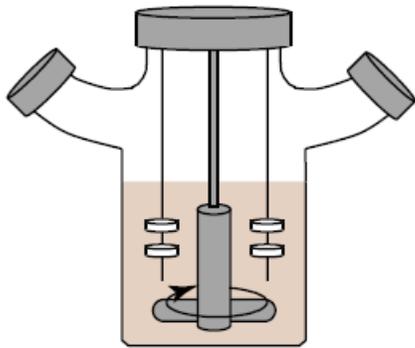
## Svantaggi:

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

# + Bioreattori: tipologie

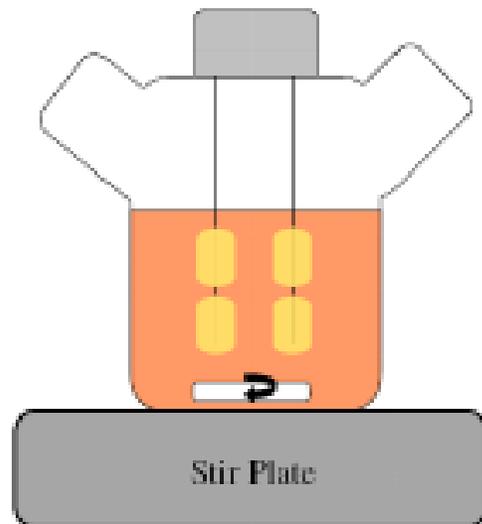
I bioreattori possono essere classificati in:

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

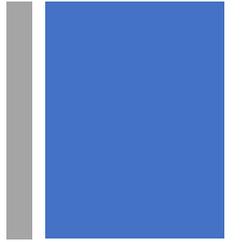


# + Spinner flasks

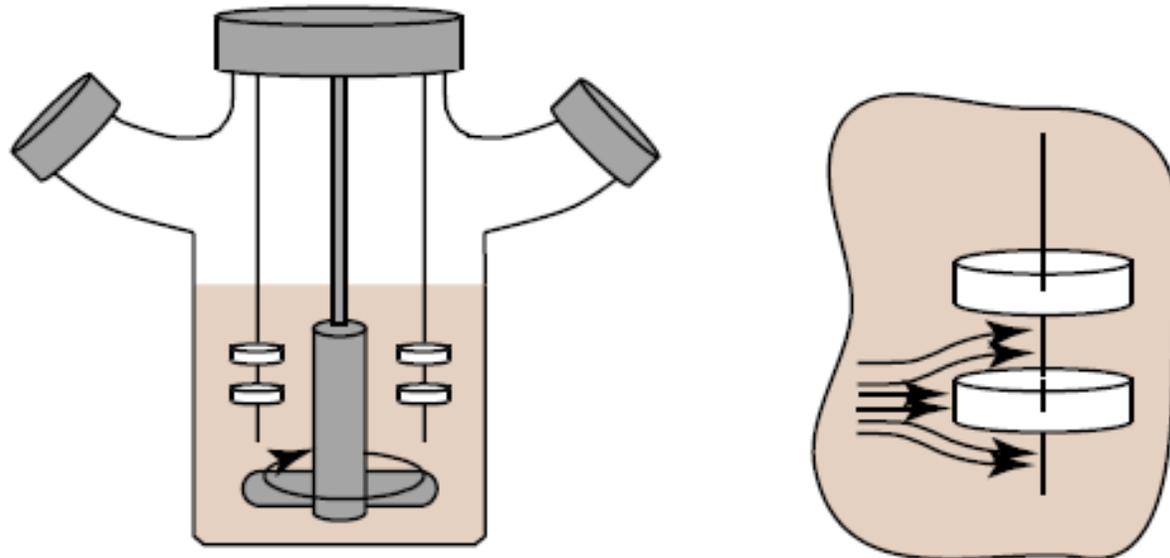
- Il principale esempio di bioreattori con agitazione sono le **spinner flasks**, in cui il **mezzo di coltura** è **agitato meccanicamente** attraverso una barretta magnetica messa in rotazione da un campo magnetico.
- L'agitazione può essere studiata o dimensionata per imporre stimoli di intensità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



## + Spinner flasks

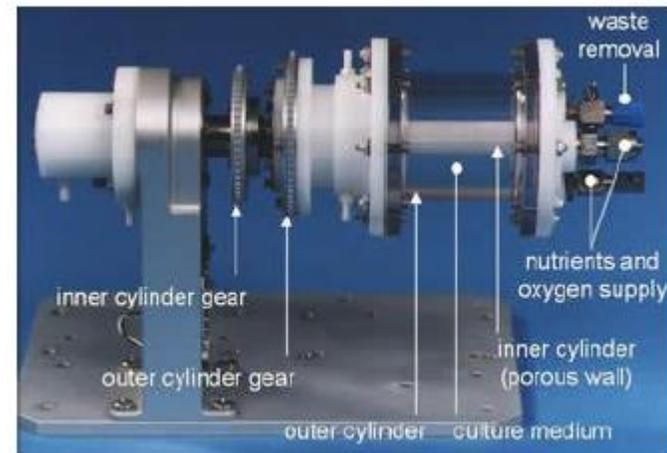
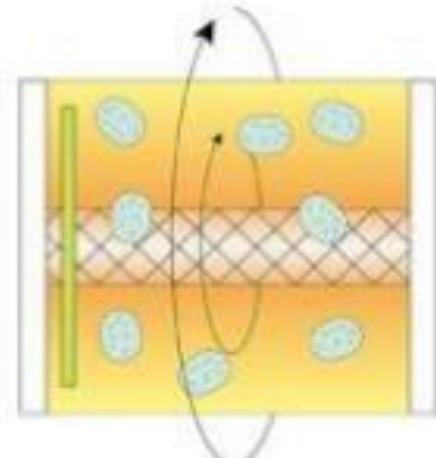


Le spinner flasks, vengono principalmente utilizzate per **ottenere una distribuzione uniforme delle cellule sugli scaffold**. Gli scaffold sono **tenuti sospesi** da appositi sostegni e **l'agitazione** mantiene le **cellule**, presenti nel mezzo, **in sospensione**, evitando che si sedimentino sul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



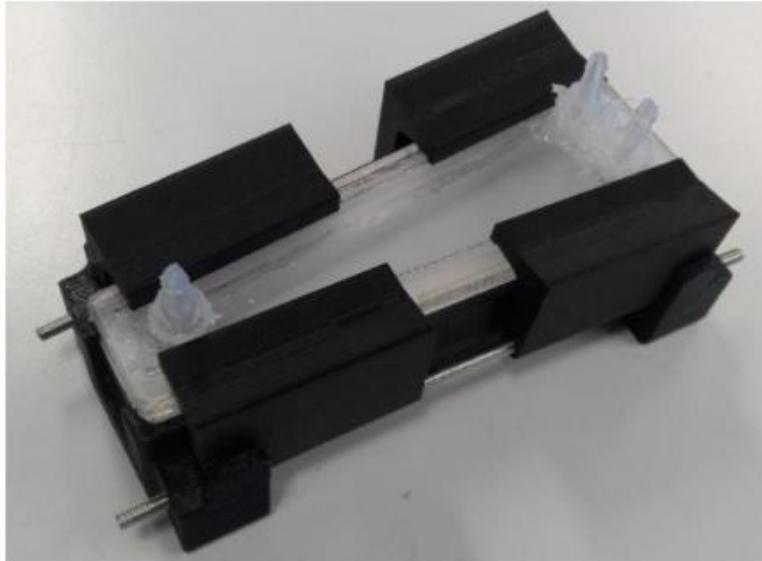
## + Bioreattori a parete rotante (NASA)

- 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



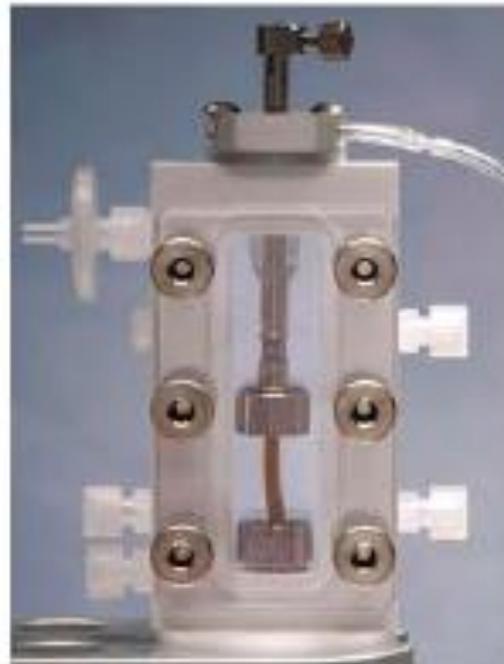
## + Bioreattori a perfusione

- 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.

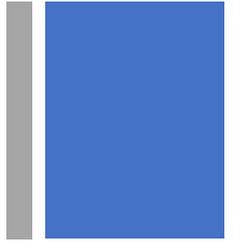


## + Bioreattori in grado di fornire stimoli fisici

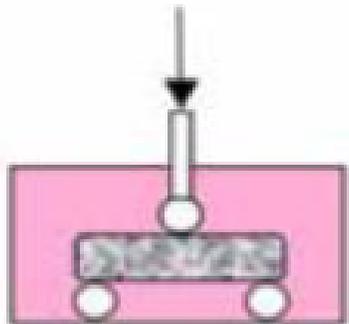
Bioreattori in grado di **imporre carichi fisiologici o sovrafisiologici** sui costrutti in coltura per **favorirne il differenziamento** o per **studiare il comportamento** cellulare in seguito a tali stimoli.



## + Bioreattori in grado di fornire stimoli fisici



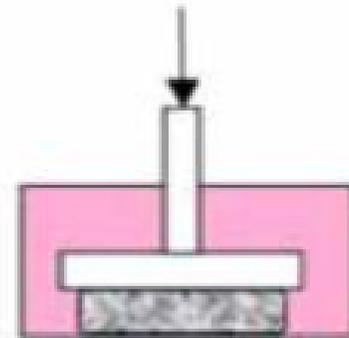
- La **stimolazione** è nota, **modellabile e finemente controllabile**.
- Gli stimoli applicabili possono essere diversi: sforzo di taglio, **compressione, trazione**, torsione.



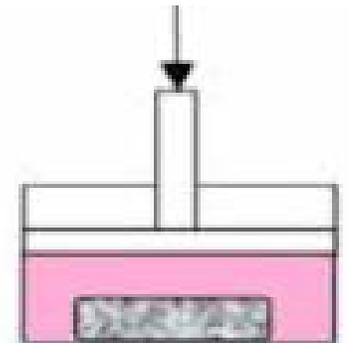
bending



tension



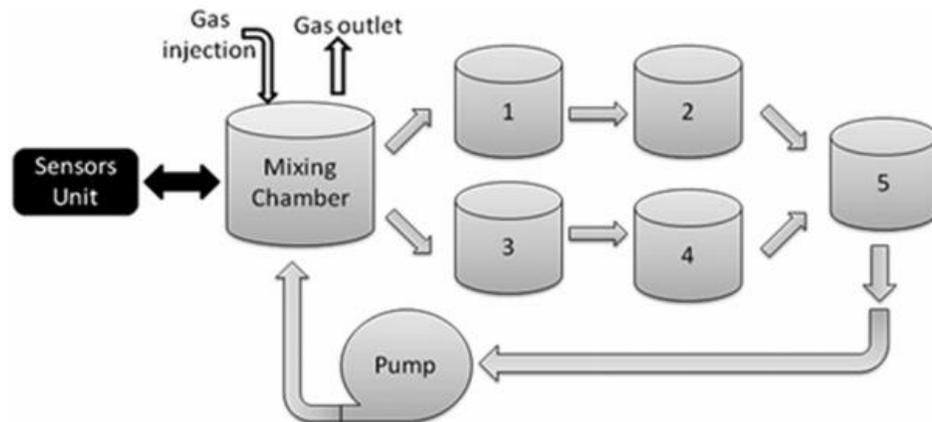
compression



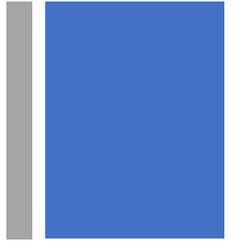
hydrostatic pressure

## + Bioreattori per connettere colture cellulari diverse

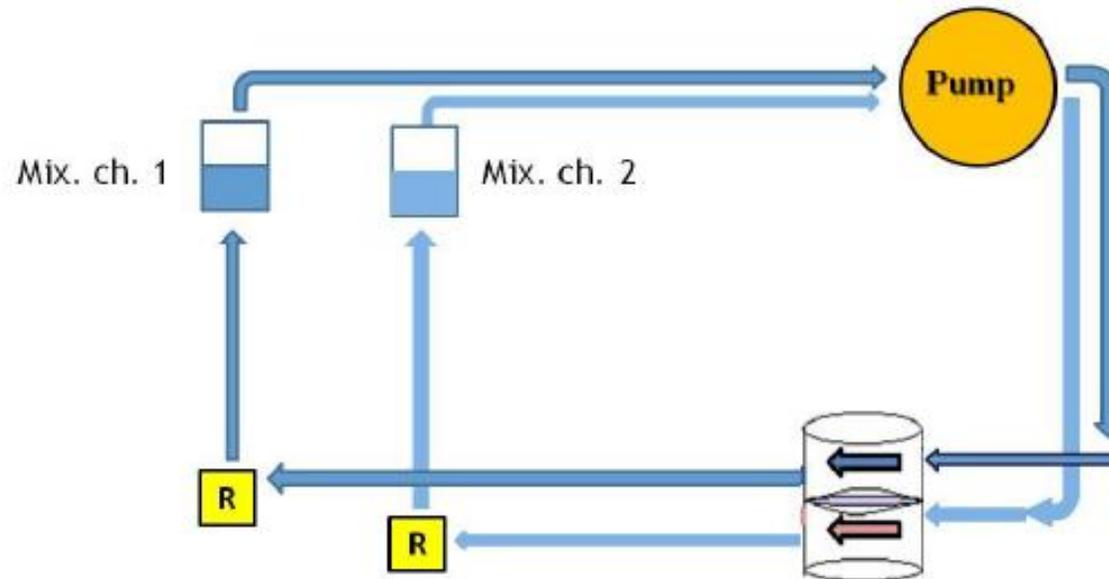
- È possibile **connettere colture cellulari** diverse attraverso l'uso di **bioreattori**.
- Il modo più immediato è attraverso l'**unione di single camera di coltura in un unico sistema**.
- Il **limite** principale di questo metodo è la possibilità di **usare un unico mezzo di coltura**.



## + Bioreattori per connettere culture cellulari diverse

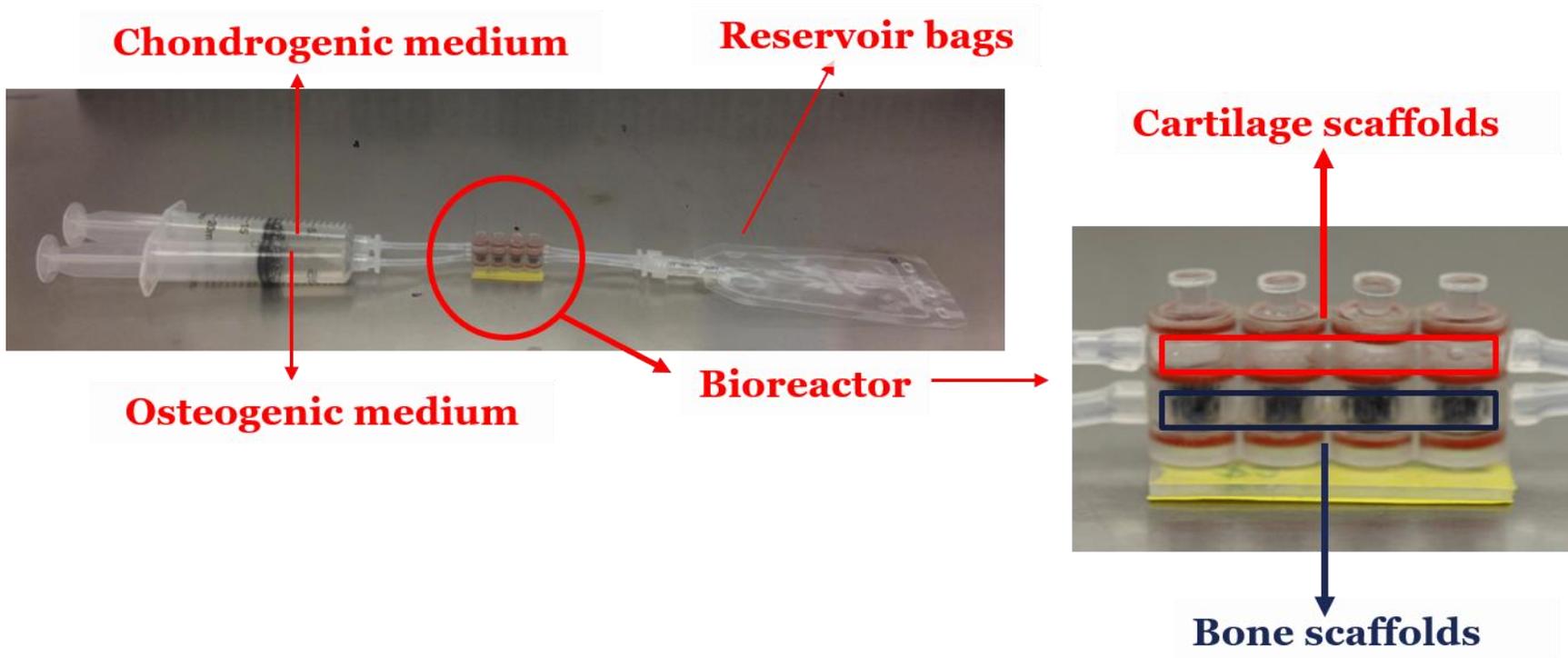


- **Bioreattori multicompartimentali:** bioreattori dotati di camere di cultura indipendenti (singoli **bioreattori a perfusione**), in cui è possibile coltivare costrutti diversi.
- L'unica connessione tra le due camera è attraverso i costrutti stessi; ciò permette di analizzare il cross-talk tra costrutti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



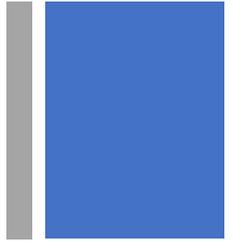
# + Bioreattori per connettere culture cellulari diverse

Bioreattore con doppia camera per la coltura di costrutti osteocondrali.



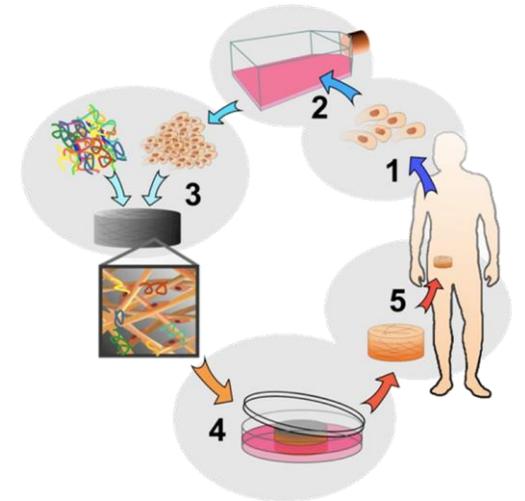
- Thomas P., et al. "Three-dimensional osteochondral microtissue to model pathogenesis of osteoarthritis." *Stem cell research & therapy* 4.S1 (2013): S6.e
- Lin, Hang, et al. "Stem cell-based microphysiological osteochondral system to model tissue response to interleukin-1 $\beta$ ." *Molecular pharmaceutics* 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



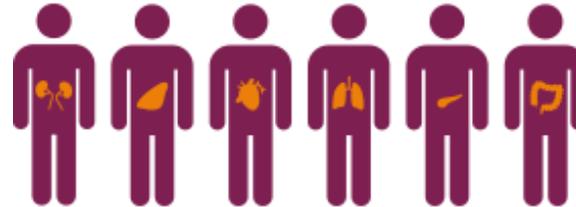
**6%**  
heart

**48 000**

new patients registered  
on waiting lists for  
transplantation last year



= nearly 6 new  
patients added  
every hour



**18** patients die  
every day

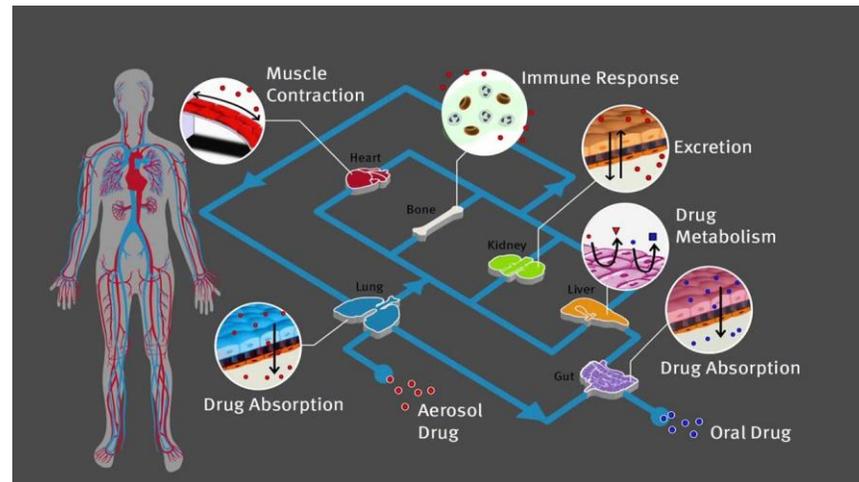
waiting for a  
transplant



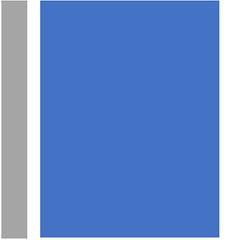
More than **6 000**  
patients on waiting lists  
died last year

## + 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**

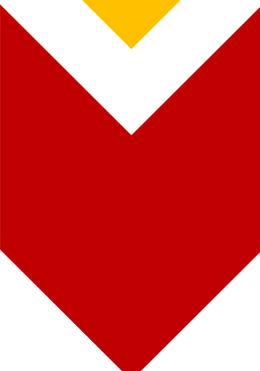


# + Translazione clinica: a che punto siamo?

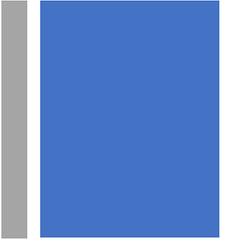


- 
- Introduzione e ottimizzazione delle tecnologie di bioprinting
  - Identificazione dei biomateriali e delle cellule più idonee
  - Biofabbricazione e cultura in vitro
  - Caratterizzazione *in vitro*
  - Test *in vivo*

- 
- 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

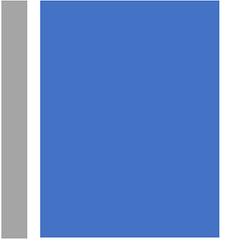
## + Translazione clinica: a che punto siamo?



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?

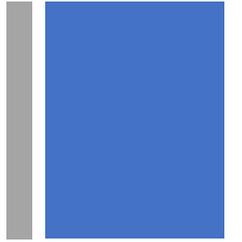
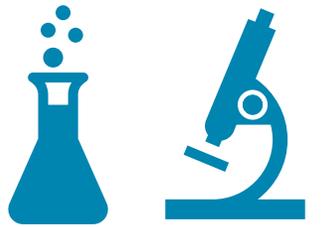


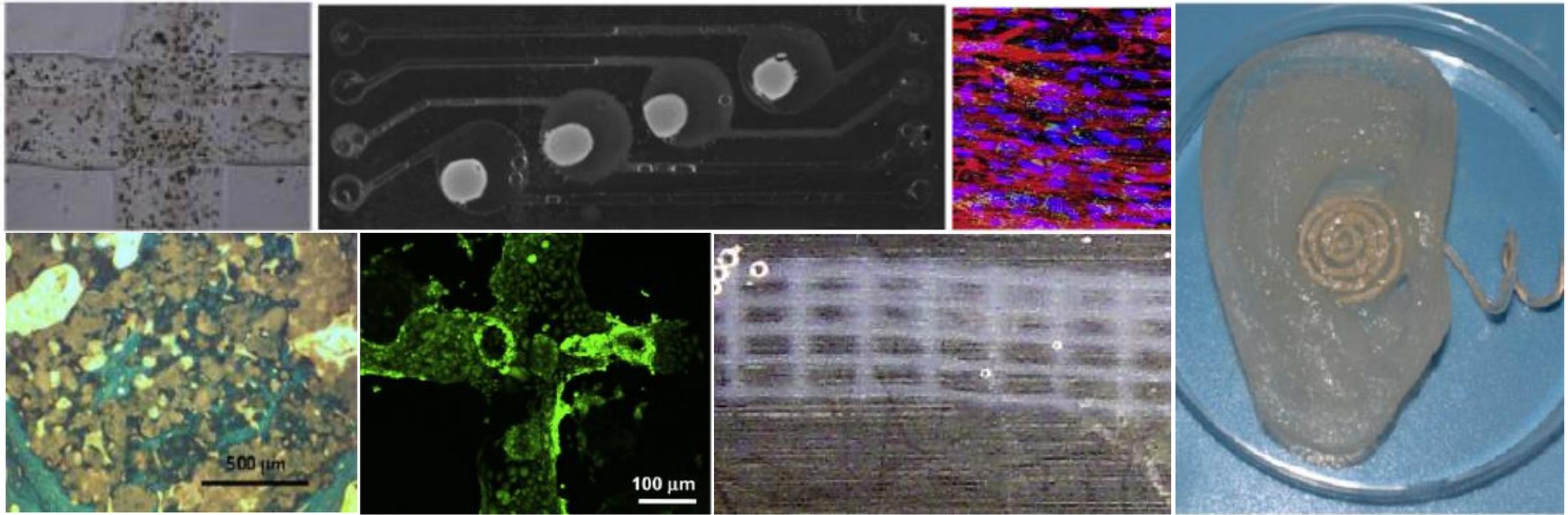
- Per la **pelle**, il bioprinting è vicino a diventare un metodo clinicamente rilevante per produrre **innesti cutanei** ed è già utilizzato nell'industria cosmetica.
- Sono in corso diversi studi clinici che utilizzano costrutti cellularizzati fabbricati con tecniche convenzionali e scaffold stampati 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

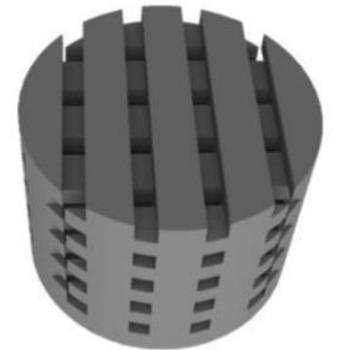
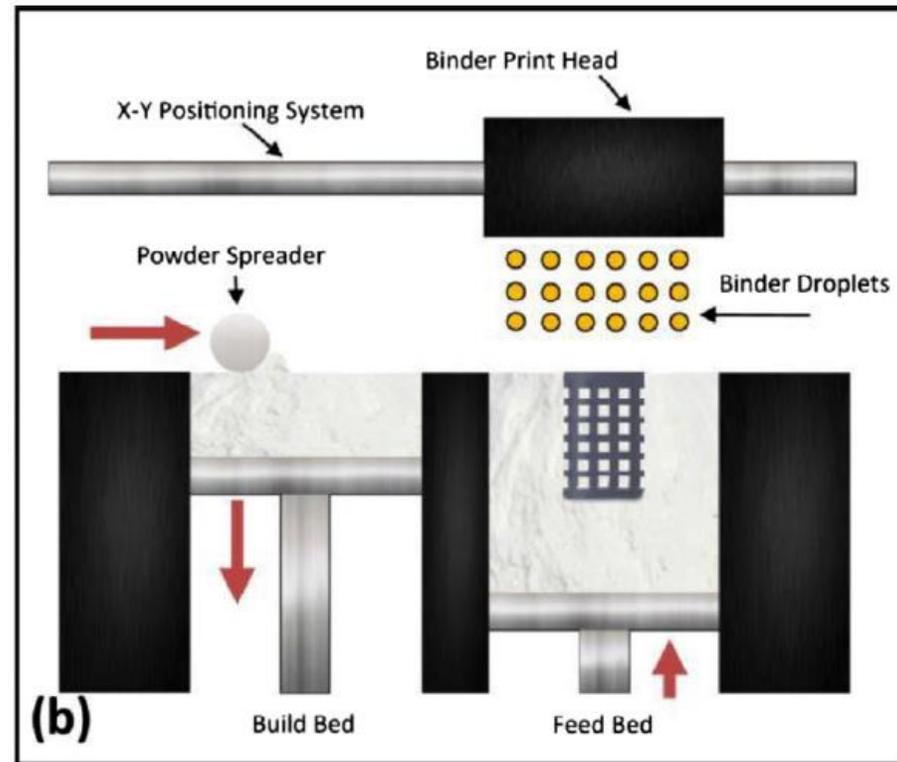
*Rilevanti studi in letteratura*

# + Tessuto osseo

SiO<sub>2</sub> and ZnO dopants in three-dimensional printed tricalcium phosphate scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis *in vivo*

Gary Fielding, Susmita Bose

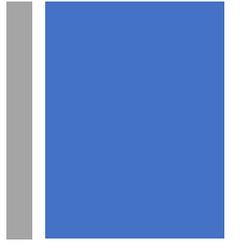
- Tecnica di bioprinting: 3D printing (getto di collante)
- Biomateriale: mixture di  $\beta$ -tricalcio fosfato e ossido di zinco (materiale ceramico)
- Tipologia di costrutto: scaffold wood-pile con pori di (317  $\mu\text{m}$ )
- Tipo di studio: Impianto in un modello murino per 16 settimane



# + Tessuto osseo

SiO<sub>2</sub> and ZnO dopants in three-dimensional printed tricalcium phosphate scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis *in vivo*

Gary Fielding, Susmita Bose

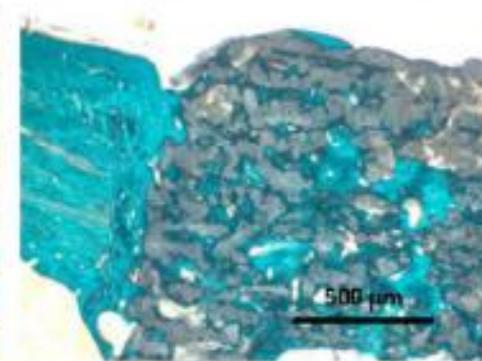
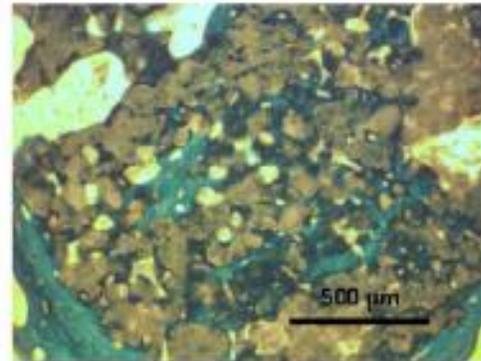
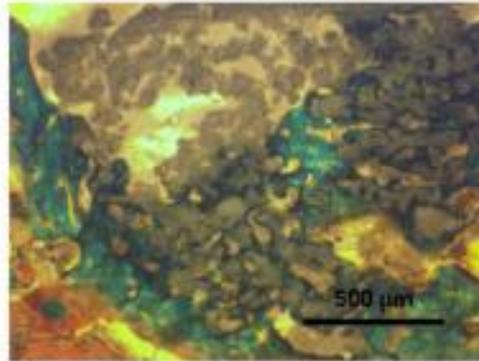


## 1. Formazione di nuovo tessuto osseo

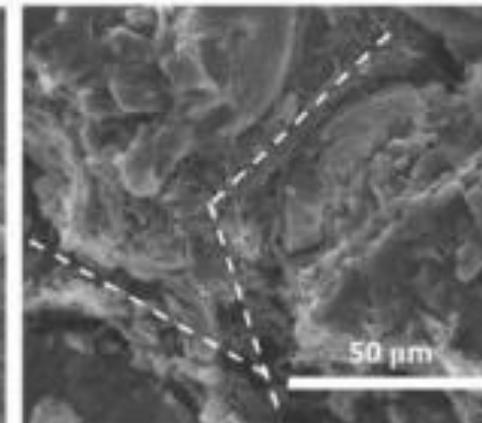
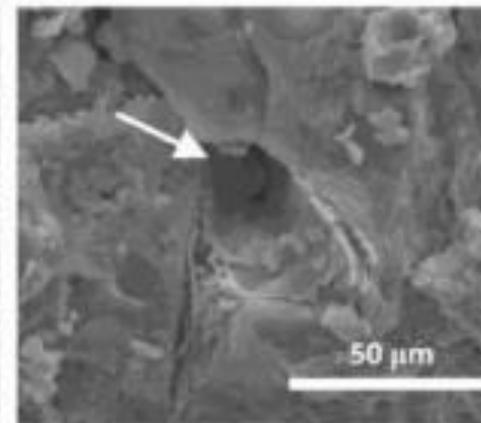
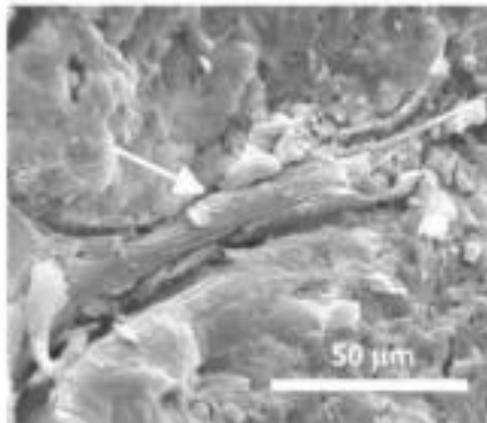
6 Weeks

8 Weeks

12 Weeks



## 2. Angiogenesi

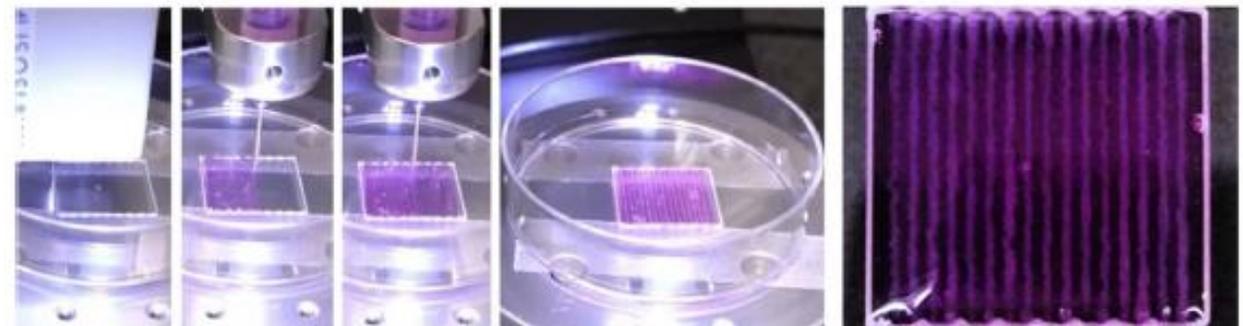
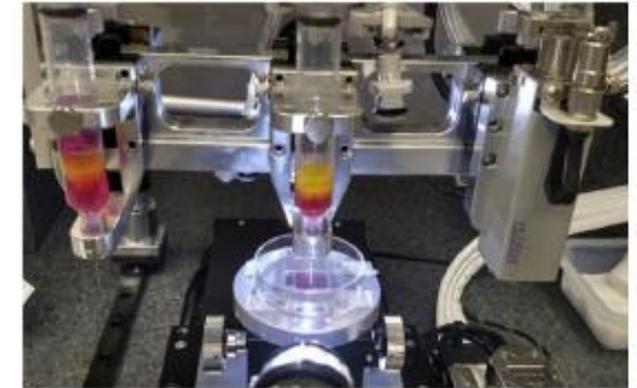
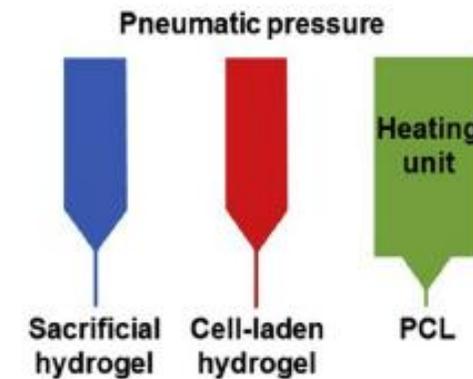
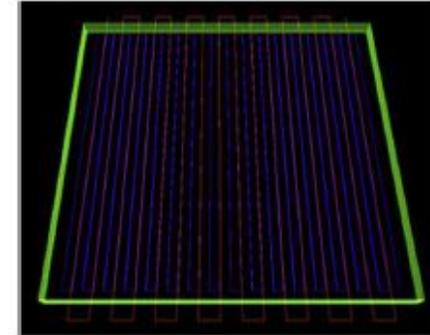


# + Tessuto cardiaco

3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs

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

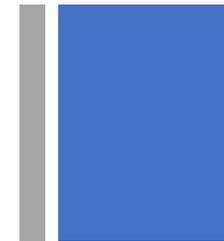
- Tecnica di bioprinting: stampa 3D ad estrusione con dispensatore multiplo
- Biomateriale:
  - bioink formato da hydrogel a base di fibrinogeno contenente cardiomiociti
  - Hydrogel di origine naturale come materiale sacrificale
  - PCL come framework
- Tipologia di costrutto: patch a stringhe
- Tipo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

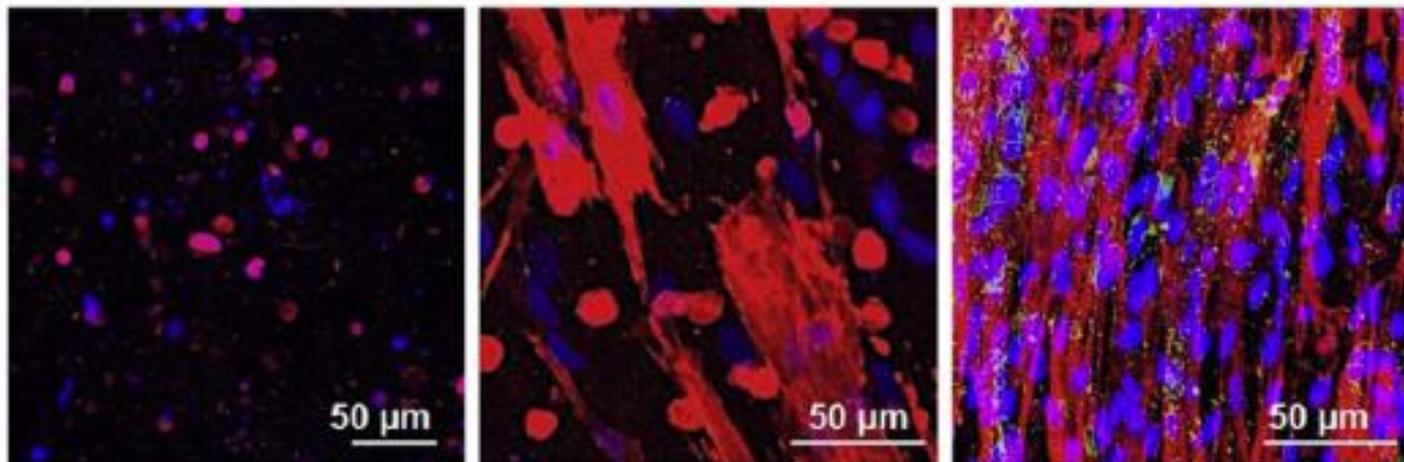


## 1. Allineamento delle fibre di $\alpha$ -actina.

Day 4

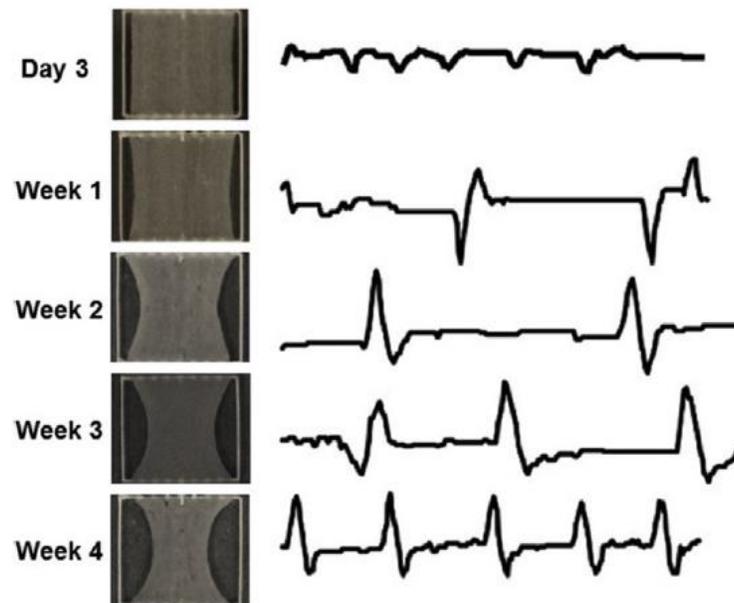
Week 1

Week 3 (low)



Rosso:  $\alpha$ -actina    Blu: nuclei

## 2. Contrazione spontanea e periodica.

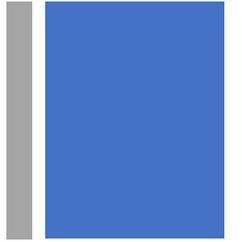


# Tessuto cardiaco

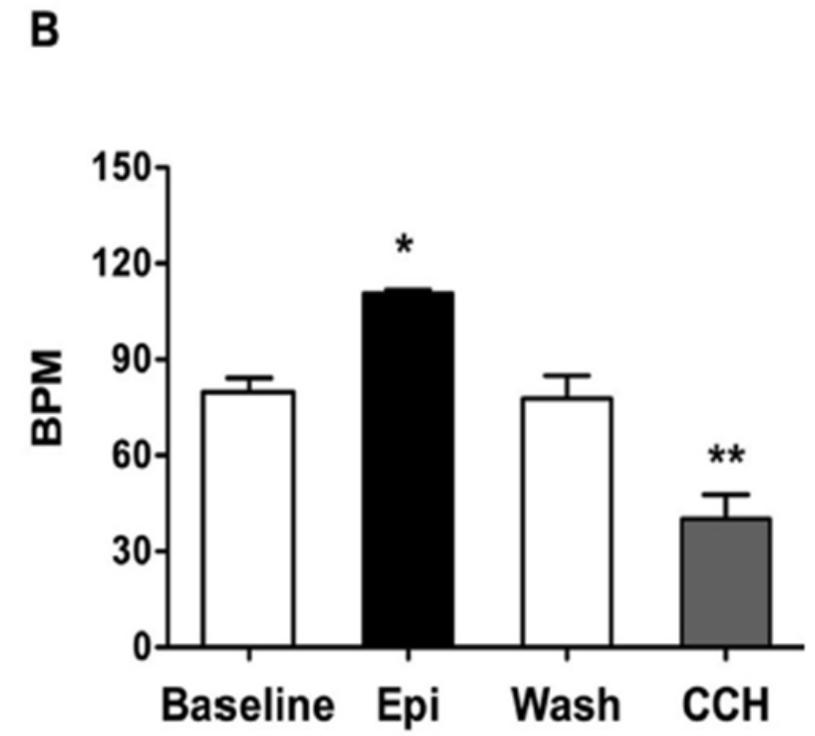
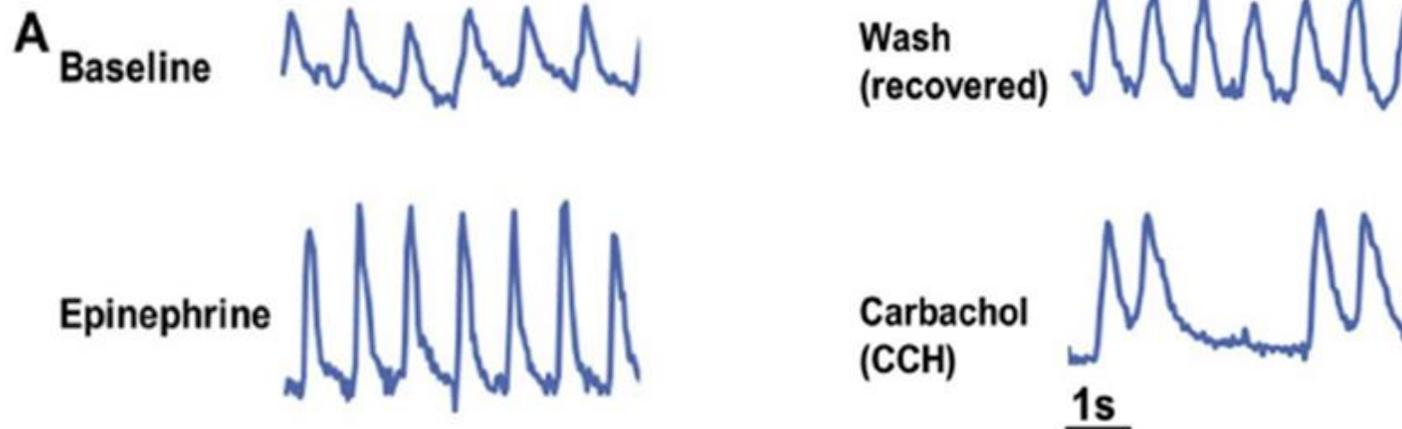


3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs

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



## 3. Risposta fisiologica a farmaci noti

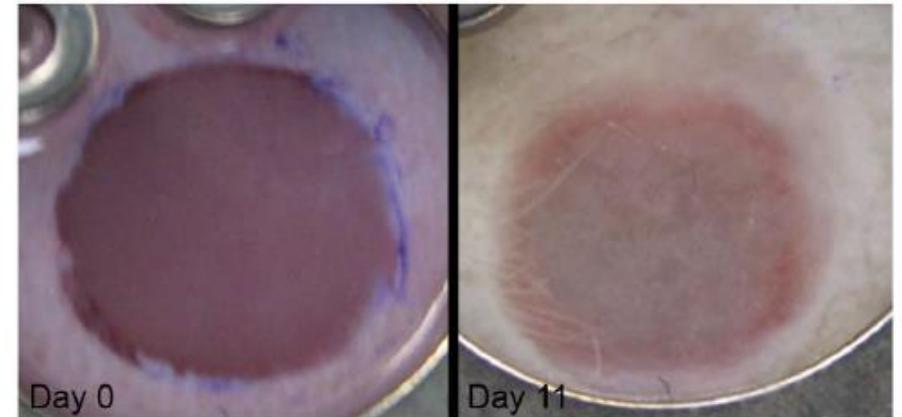
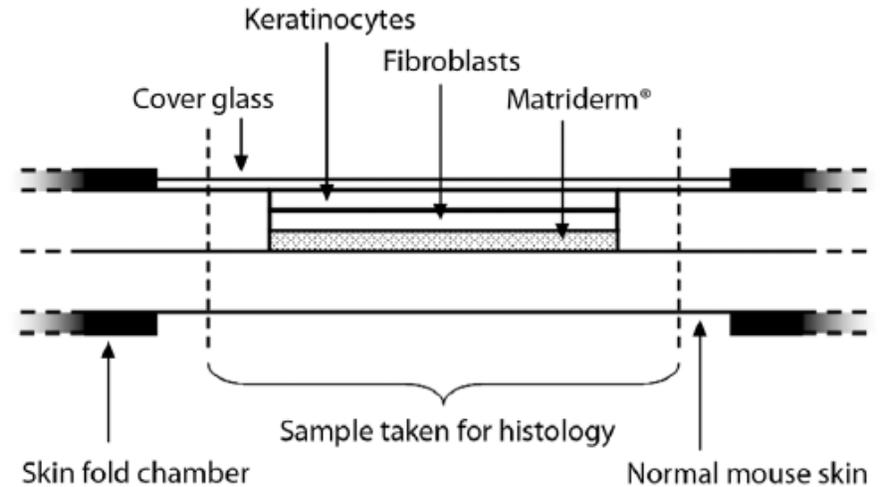


# + Pelle

## 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)



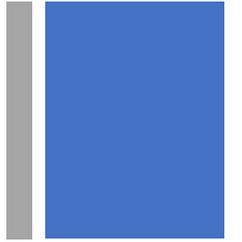
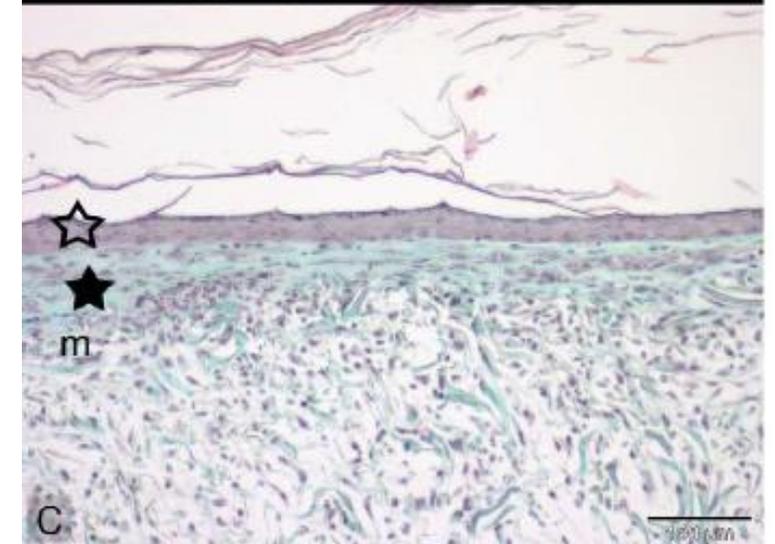
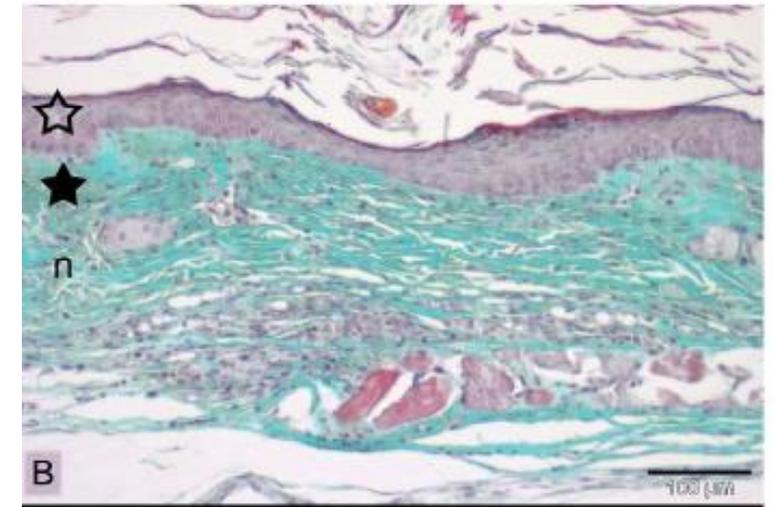
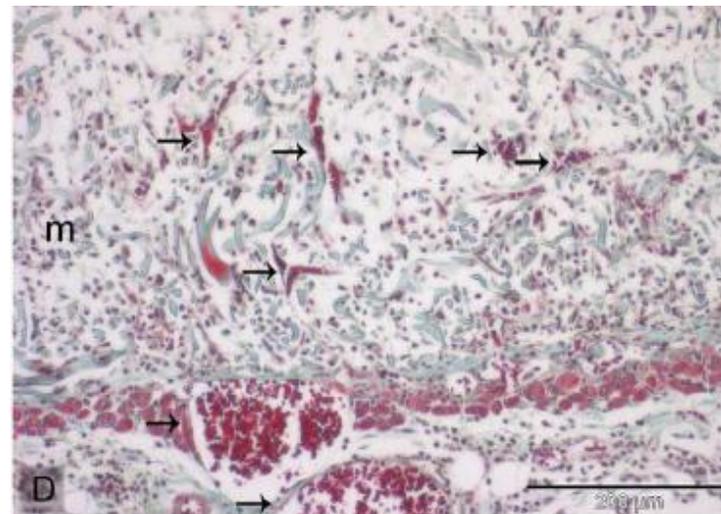
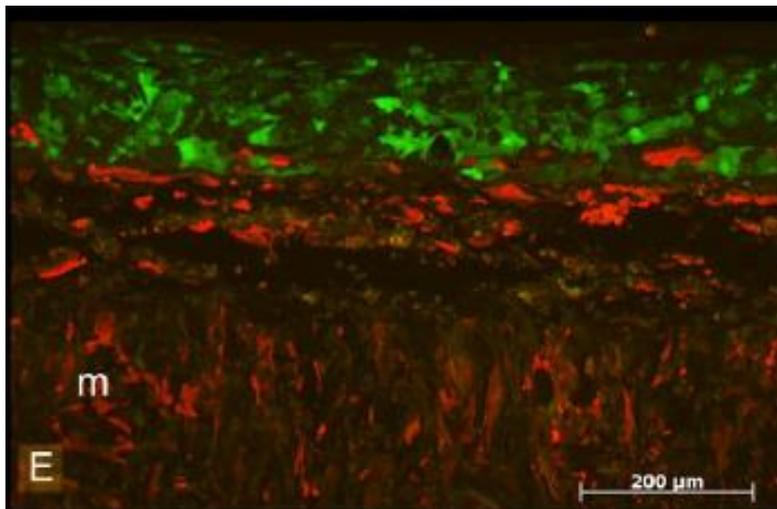
# Pelle



## 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.

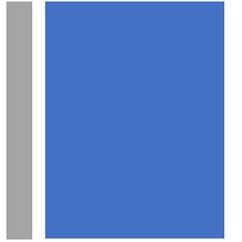
1. Formazione di uno **strato denso di cheratinociti** che mima lo strato corneo dell'epidermide
2. Deposizione di **collagene di tipo 1** da parte dei **fibroblasti**, che mima ciò che accade nel tessuto nativo
3. Colonizzazione della parte inferiore del costrutto da parte di cellule endoteliali → **angiogenesi**



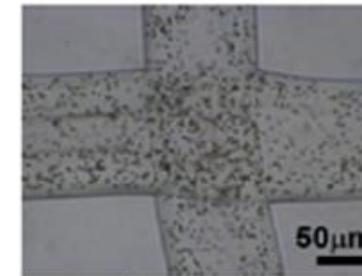
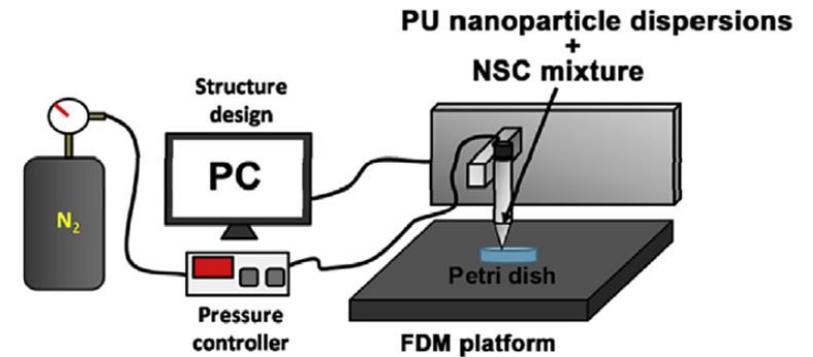
# Tessuto nervoso

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

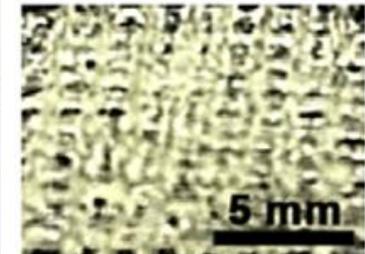
Fu-Yu Hsieh, Hsin-Hua Lin, Shan-hui Hsu



- 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**

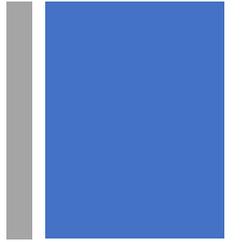


**8-layer**

# Tessuto nervoso

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

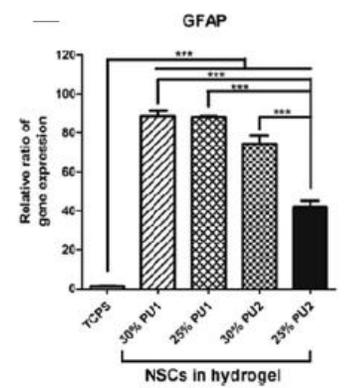
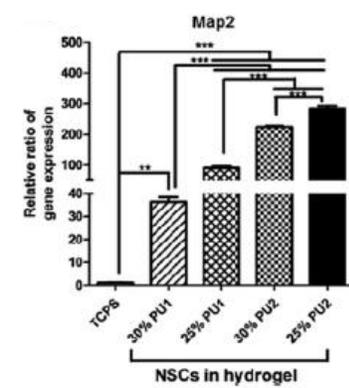
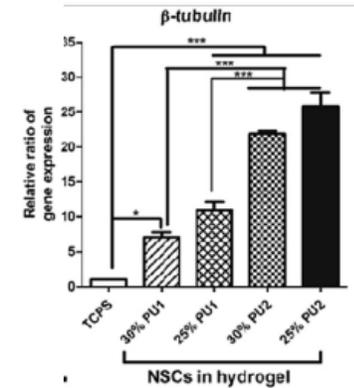
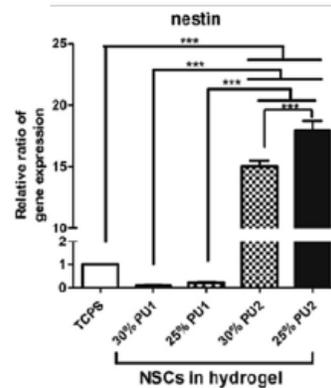
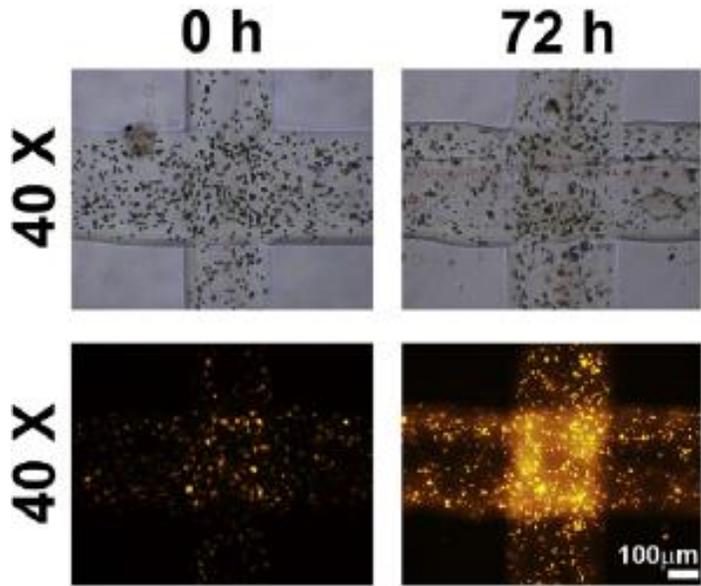
Fu-Yu Hsieh, Hsin-Hua Lin, Shan-hui Hsu



## TEST IN VITRO

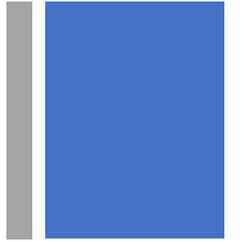
1. Aumento della proliferazione e della attività cellulare nel tempo

2. Differenziamento delle cellule staminali neurali in cellule nervosa mature



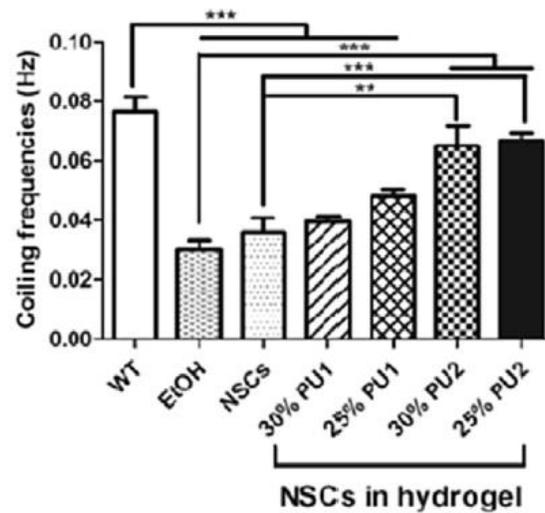
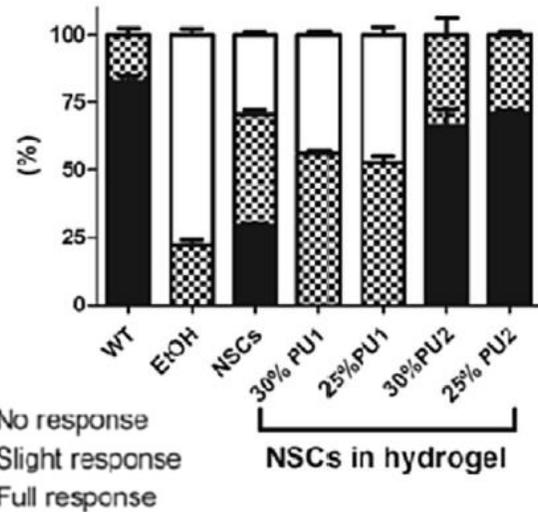
# Tessuto nervoso

+ 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

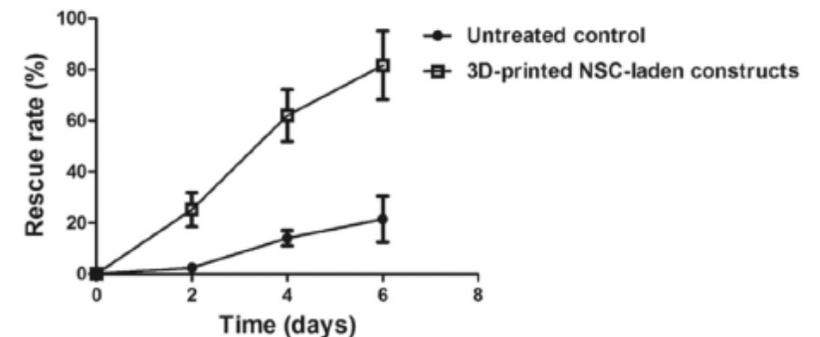
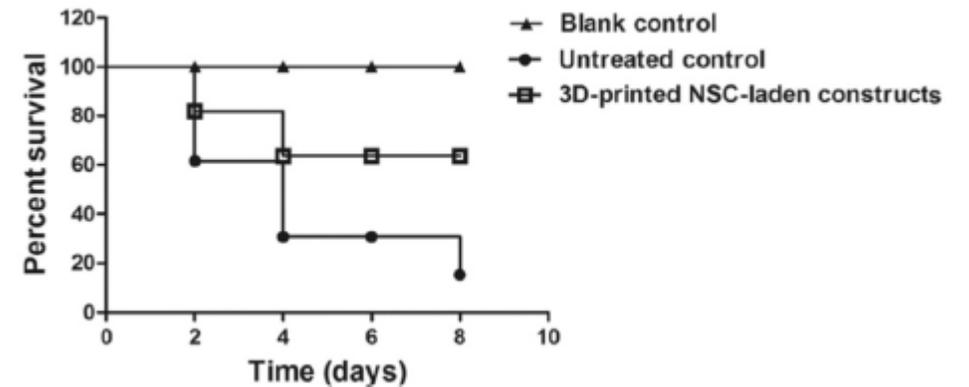


## TEST IN VIVO

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

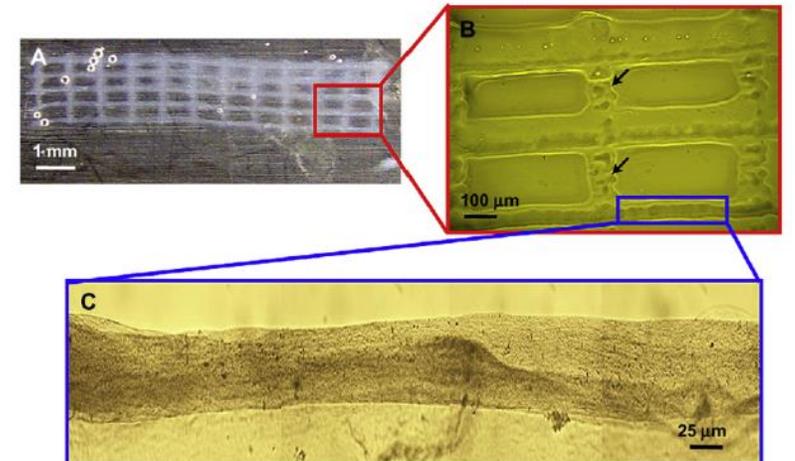
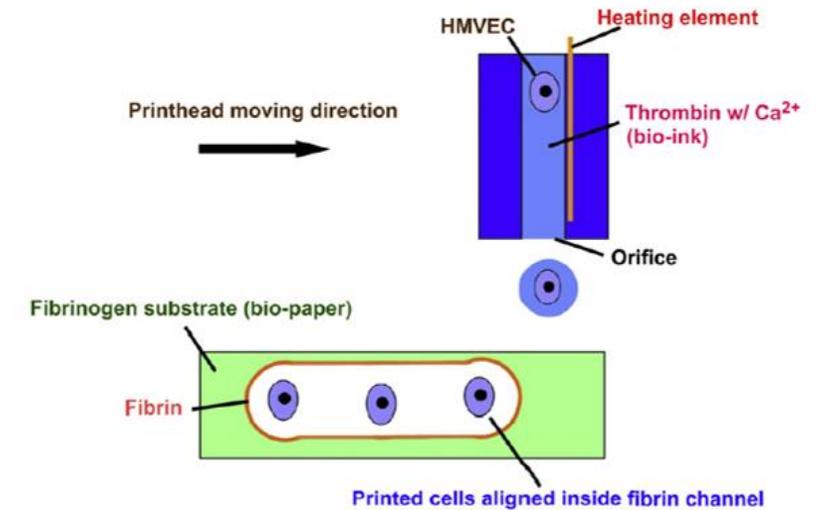


# Sistema vascolare

## + 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*

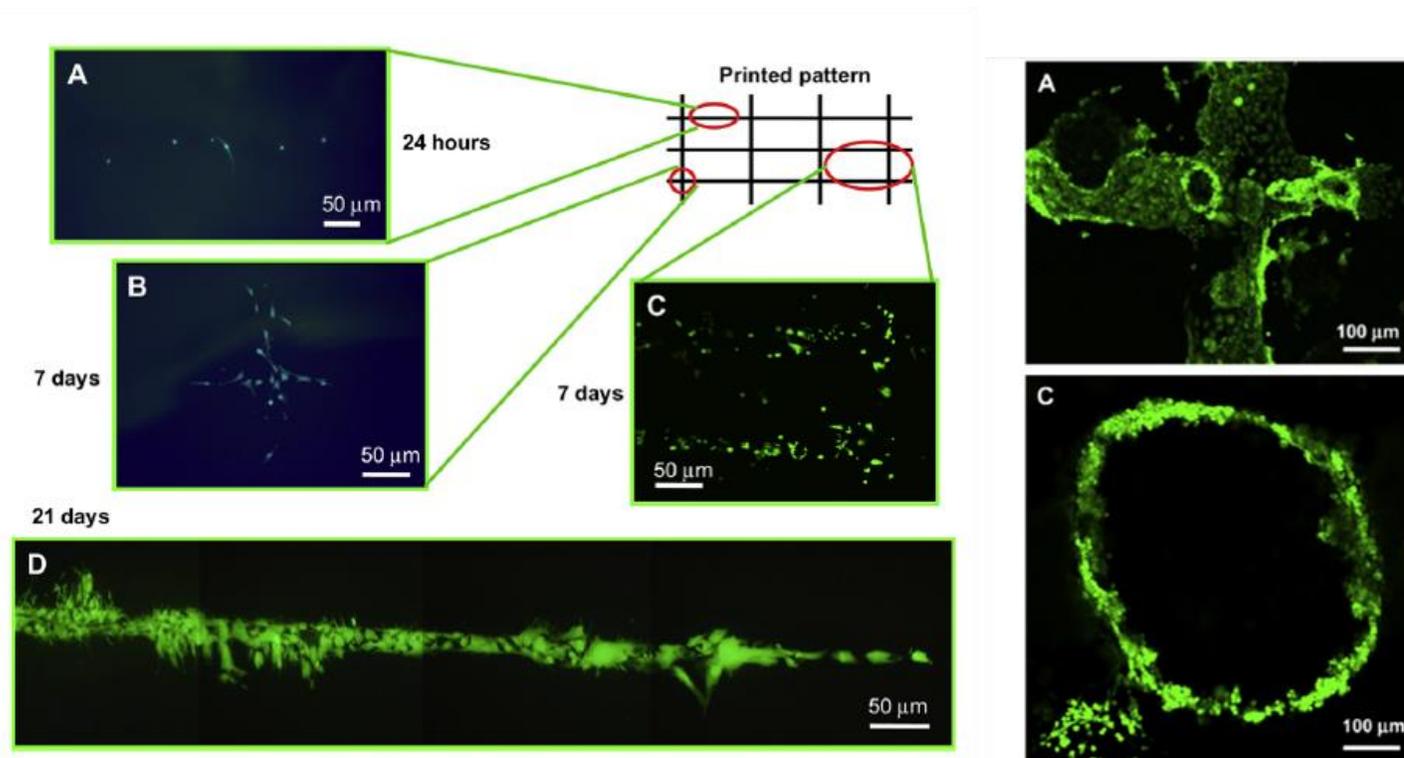


# Sistema vascolare

- + 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*



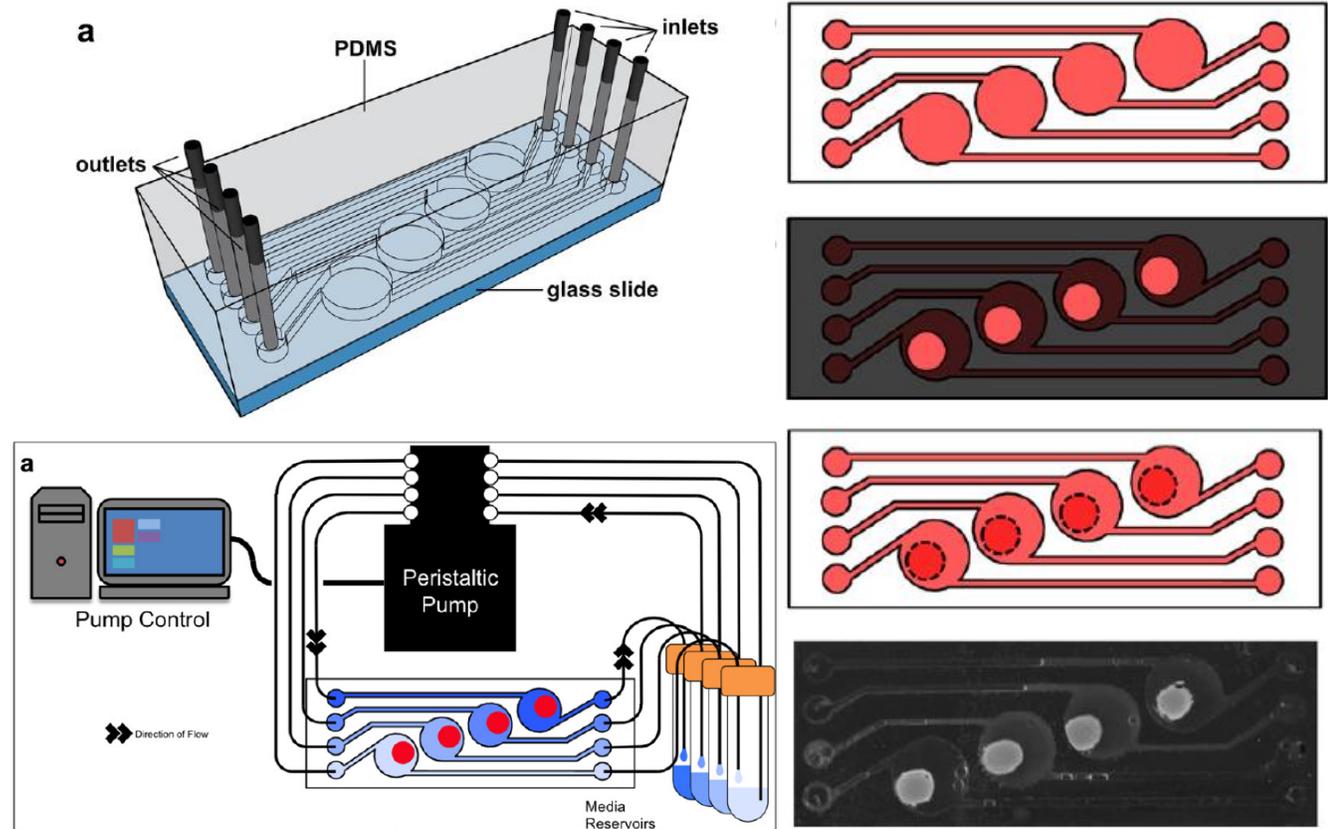
# Fegato



*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*

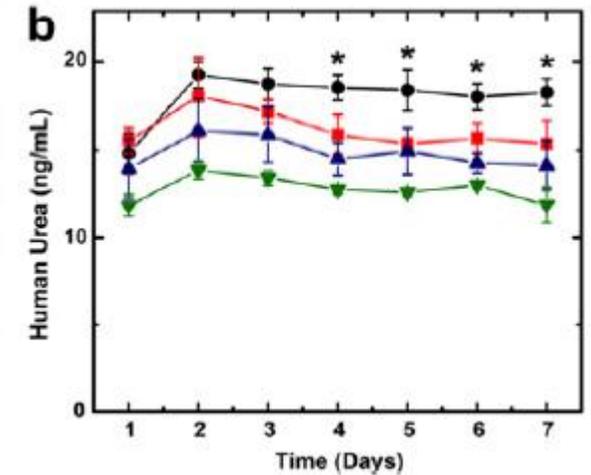
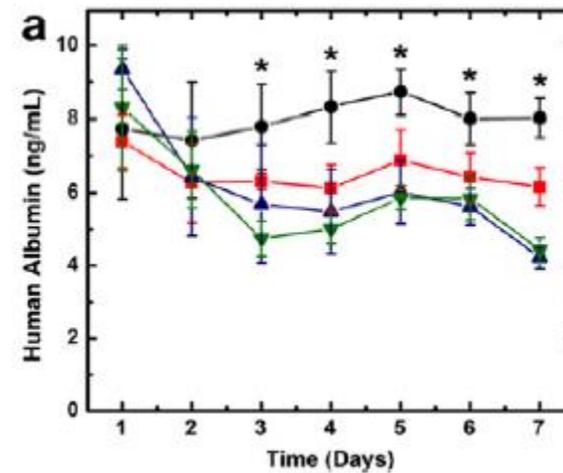
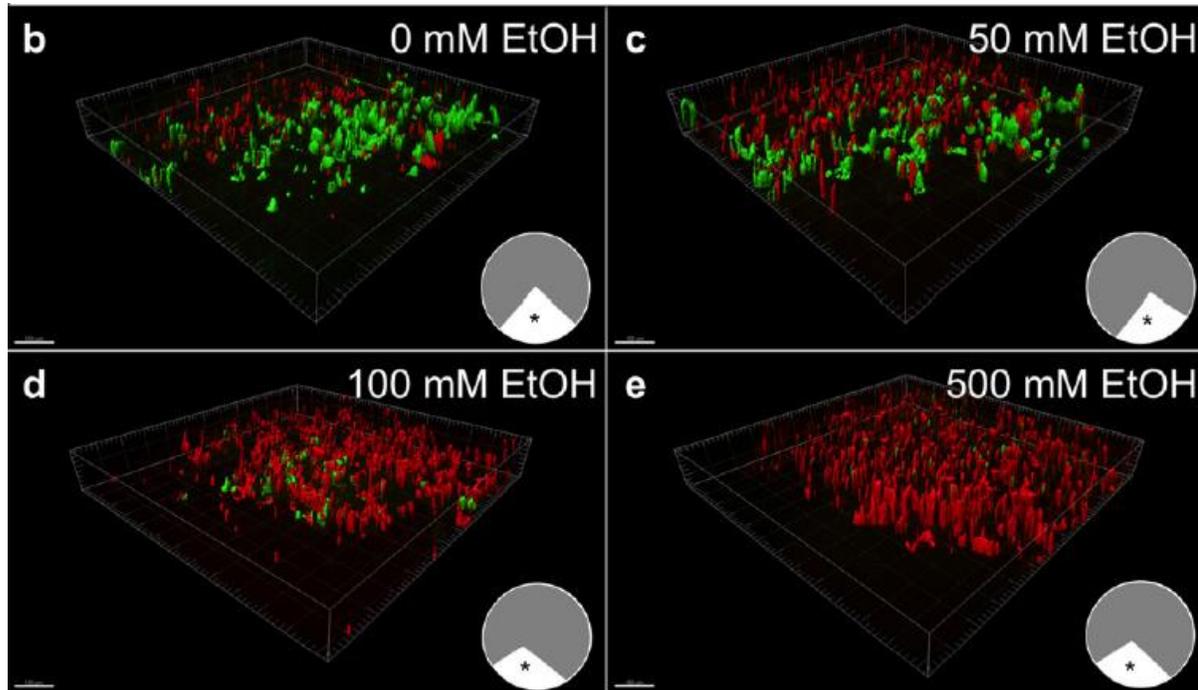


# Fegato

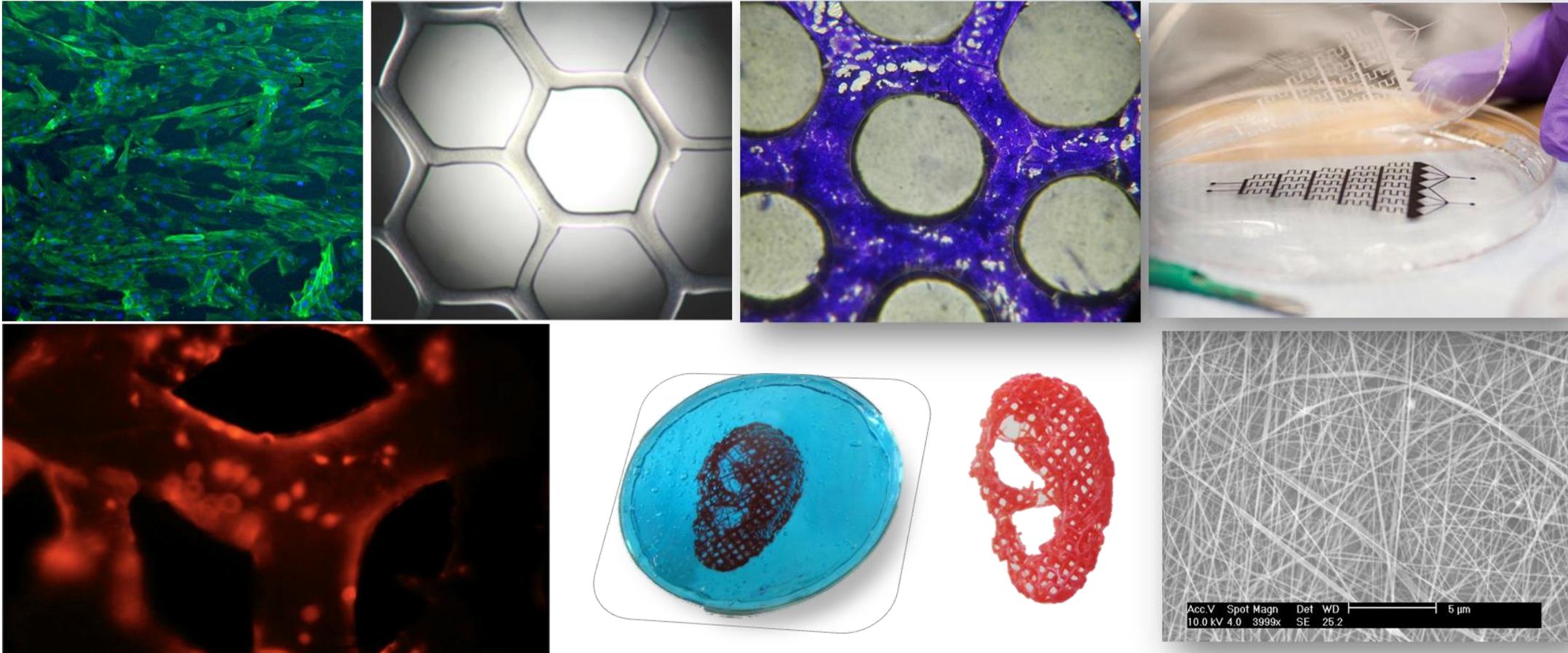
- + *In situ* patterned micro 3D liver constructs for parallel toxicology testing in a fluidic device

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

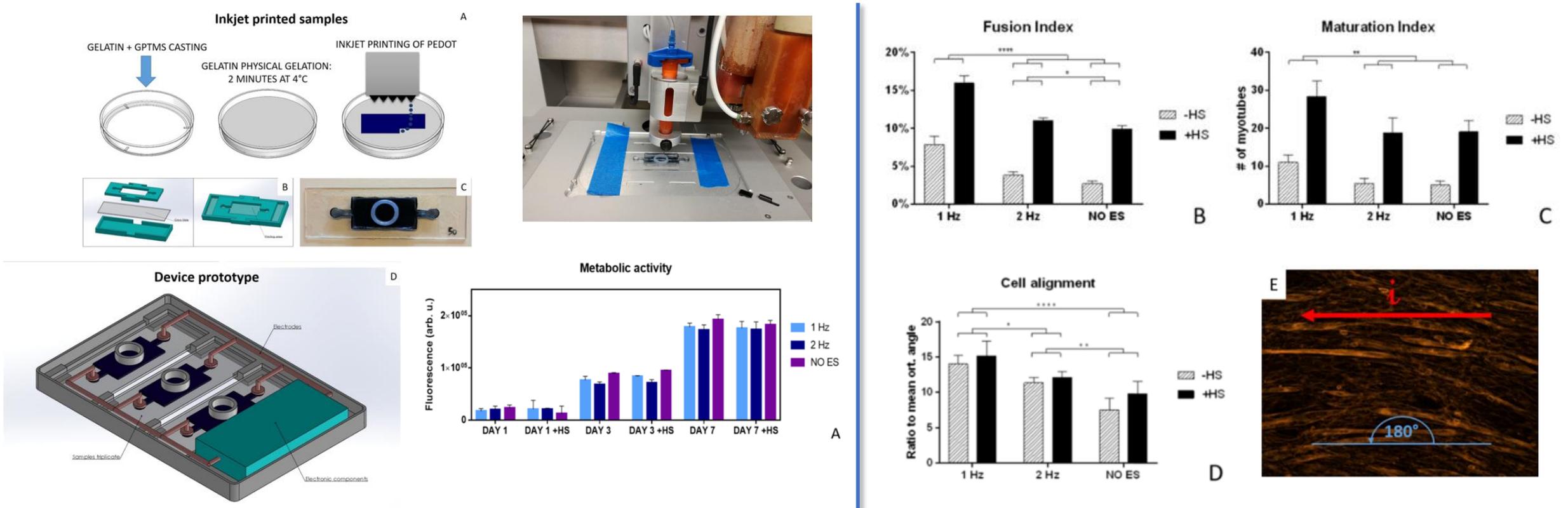


# Biofabbricazione @ Centro di Ricerca Enrico Piaggio

# + 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**

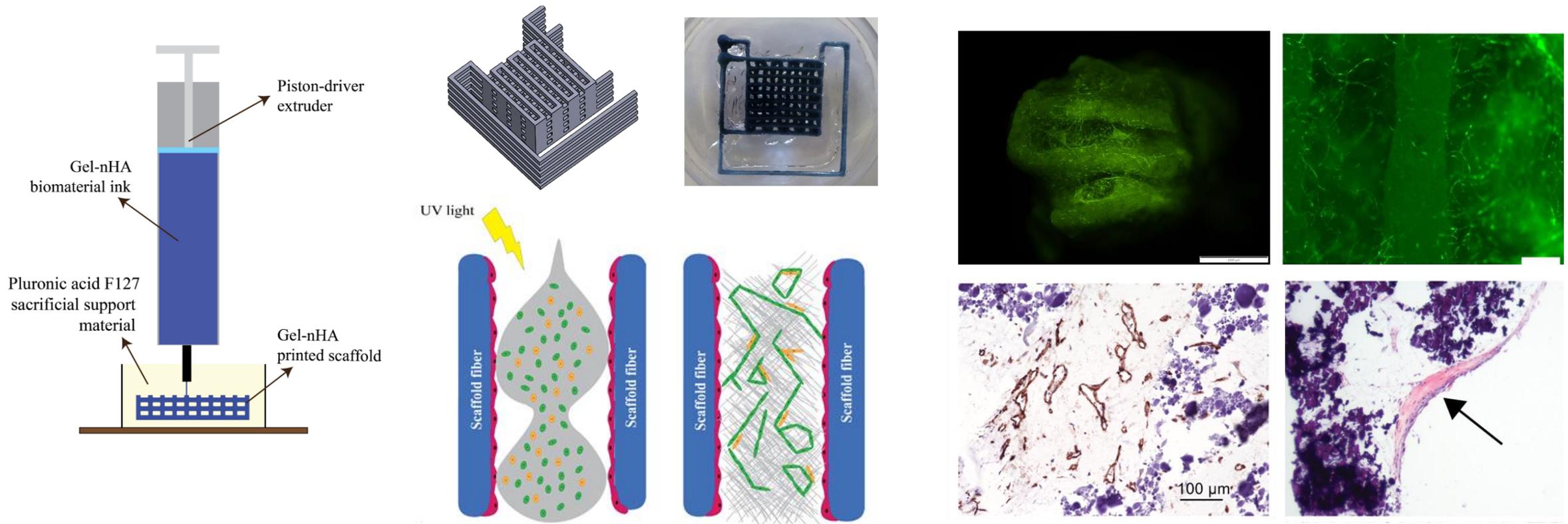


- Fortunato, Gabriele Maria, et al. "An ink-jet printed electrical stimulation platform for muscle tissue regeneration." *Bioprinting* 11 (2018): e00035.

# + 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

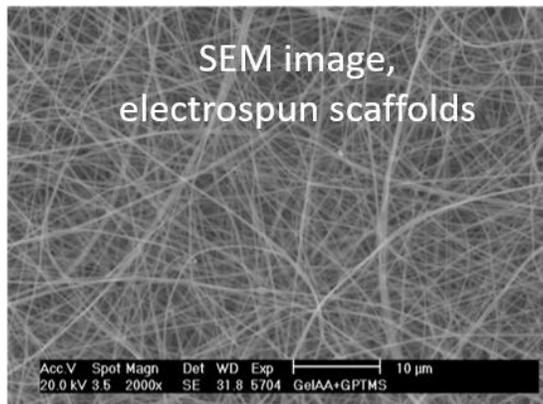


- Chiesa, I. De Maria, C. Lapomarda, A, Fortunato G. M., Montemurro, F. et al. (2020). Endothelial cells support osteogenesis in an *in vitro* vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6a1d>

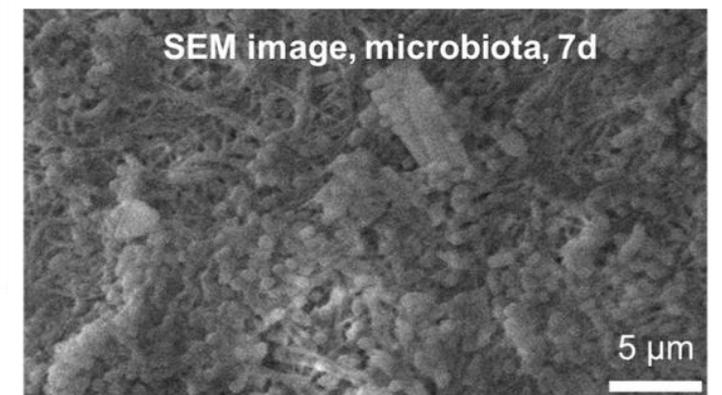
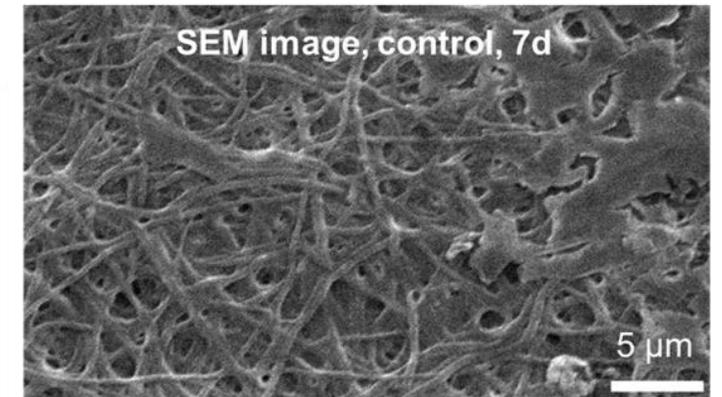
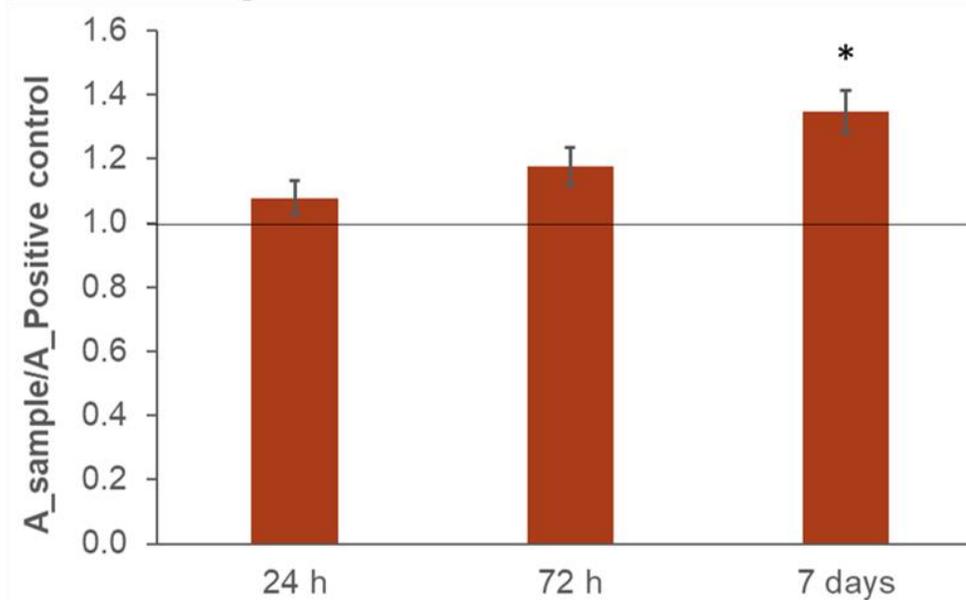
# + Scaffold elettrospinnati per lo studio *in vitro* del microbiota intestinale



**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**



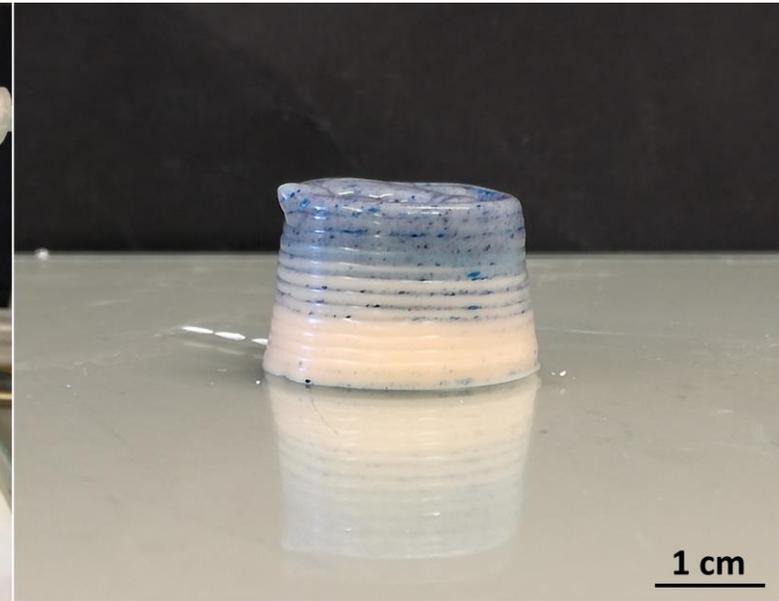
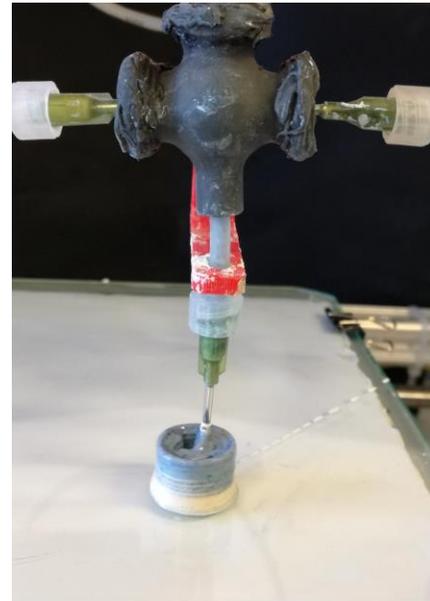
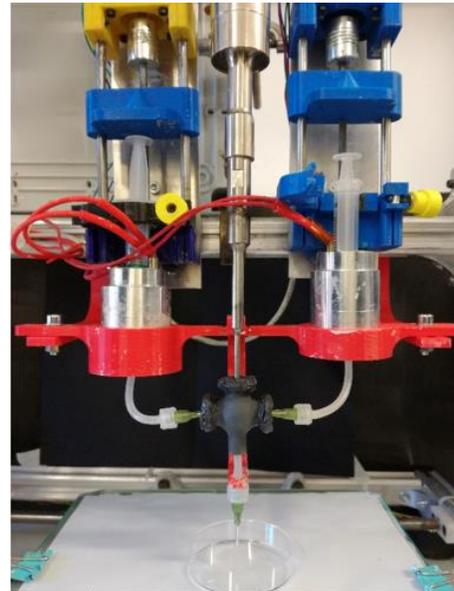
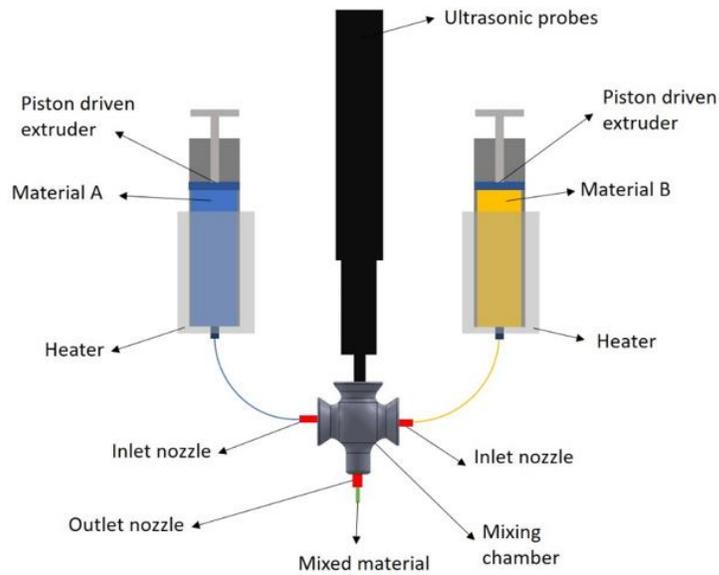
### Human gut microbiota biofilm formation



# + Stampa 3D ad estrusione di strutture graduate



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

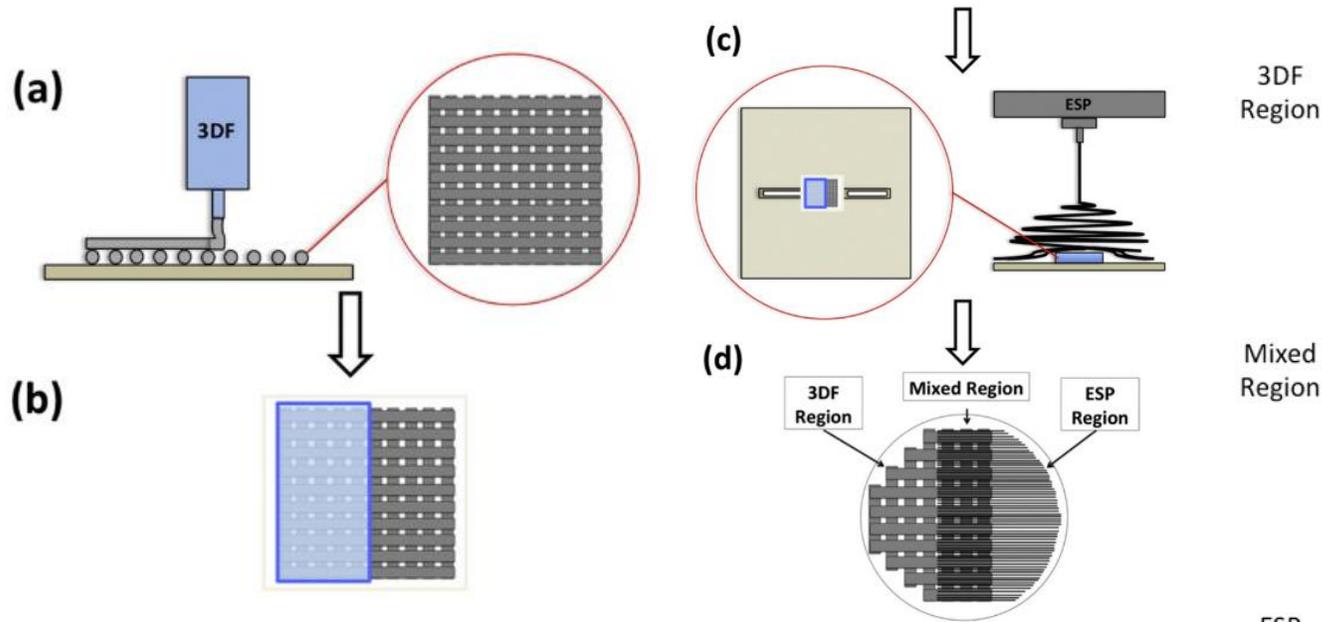


- Chiesa, I., Fortunato, G. M., Lapomarda, A., Di Pietro, L., Biagini, F., De Acutis, A., ... & Vozzi, G. (2019). Ultrasonic mixing chamber as an effective tool for the biofabrication of fully graded scaffolds for interface tissue engineering. *The International journal of artificial organs*, 0391398819852960.

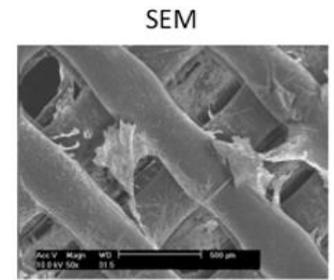
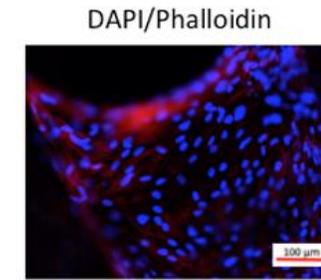
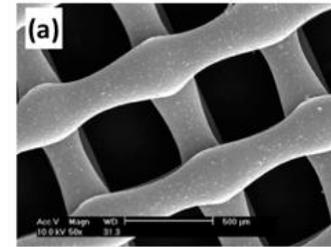
# +Scaffold trifasici per la rigenerazione del legamento



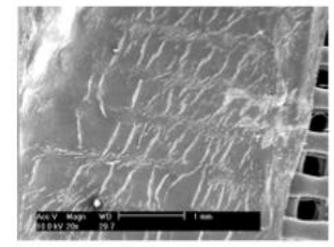
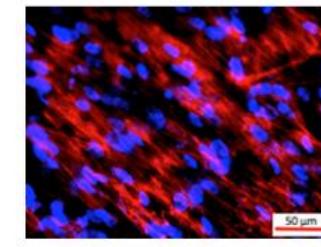
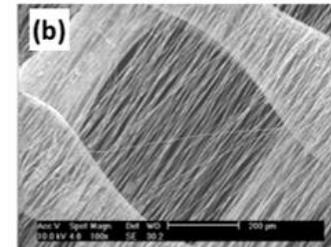
Combinazione di stampa 3D ad estrusione ed electrospinning per la fabbricazione di scaffold funzionalmente graduate per la rigenerazione dell'interfaccia osso-legamento



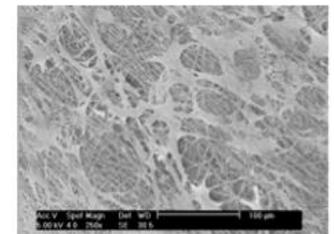
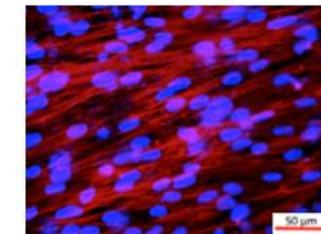
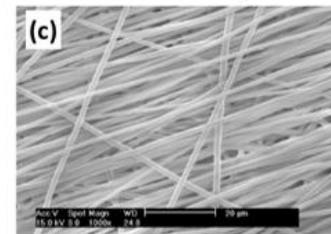
3DF Region



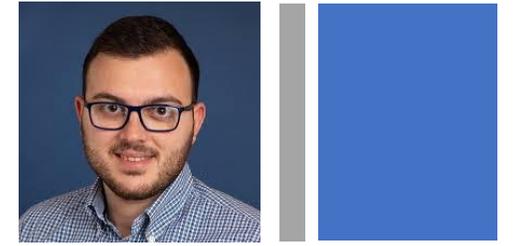
Mixed Region



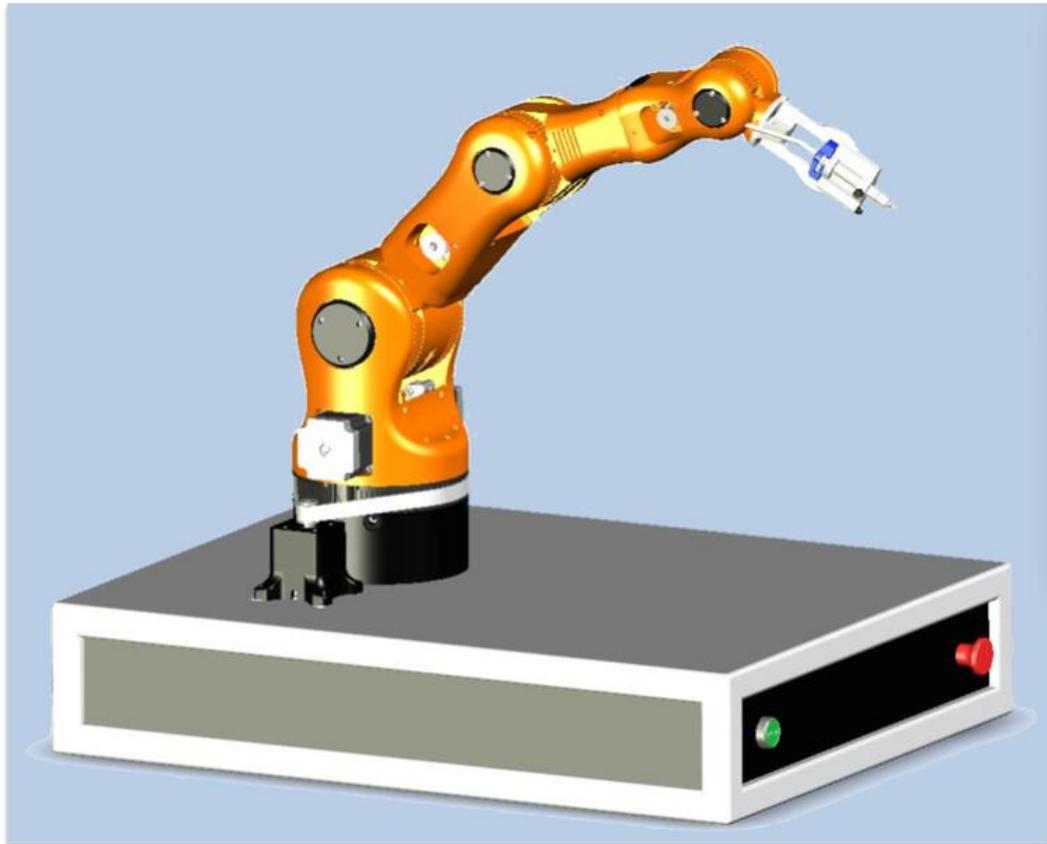
ESP Region



# + 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](http://www.centropiaggio.unipi.it/research/biofabrication.html)

