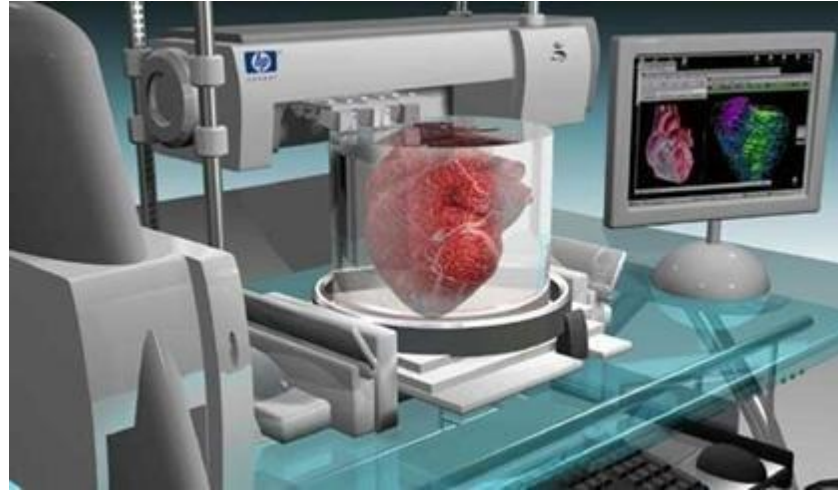


Organ Printing

Gloria Avila, Irene Cascavilla, Roberto Donnalioia, Lorenzo Nuti, Nicola Puligheddu, Marco Sanna



- Una delle ultime innovazioni nell'industria medica
- Possibilità di stampare direttamente tessuti umani
- Utilizzo di stampanti 3D
- Deposizione strato su strato di biomateriali
- OBIETTIVO ➔ sostituire un organo umano con uno stampato



Bioink

- Cellule e biomolecole incapsulate in idrogel
- Protezione delle cellule dalle condizioni ambientali della stampa
- 3 tipi
 - Derivati naturali → Derivato da matrice extracellulare decellularizzata (Cho)
 - Derivati sintetici
 - Derivati semisintetici

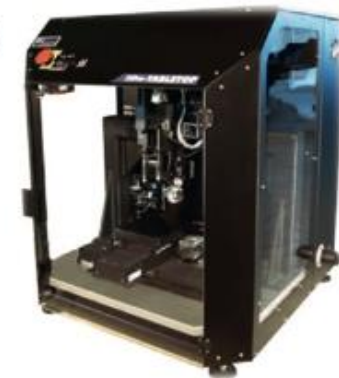
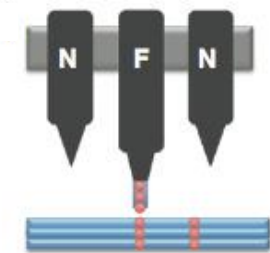
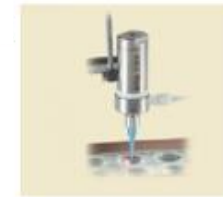


Organ printing

- Imaging medico → Modello CAD → Stampa 3D
- Sfida di ricreare microarchitettura della ECM e organizzazione dei tanti tipi di cellula
- Grande potenziale, ma risultati ancora non completamente validi clinicamente

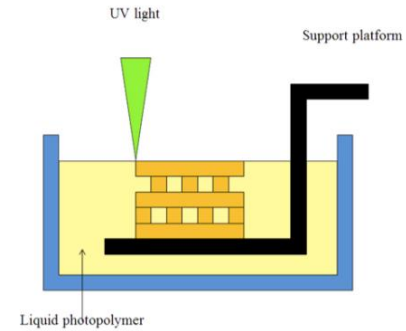
Stampanti 3D

- Stereolitografia
- Inkjet
- Dispensing

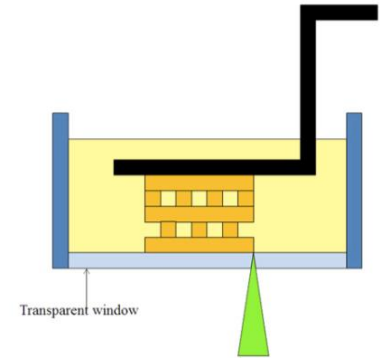


Stereolitografia

- Fotopolimerizzazione selettiva
- Bottom-up (A) ↔ Top-down (B)

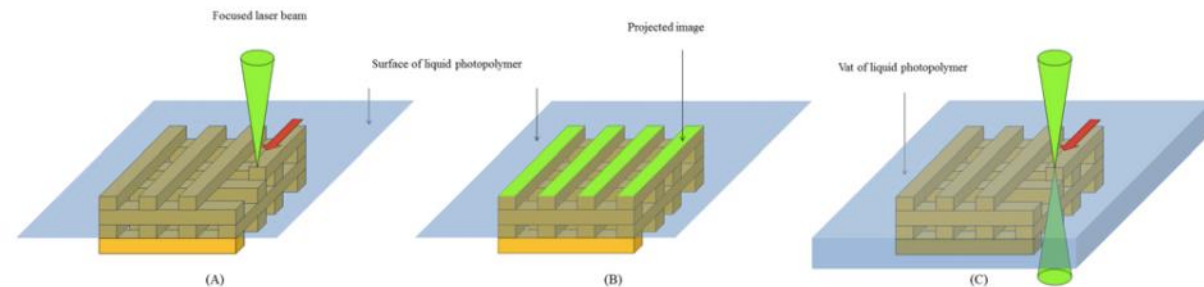


(A) Free surface condition in bottom-up approach



(B) Constraint surface condition in top-down approach

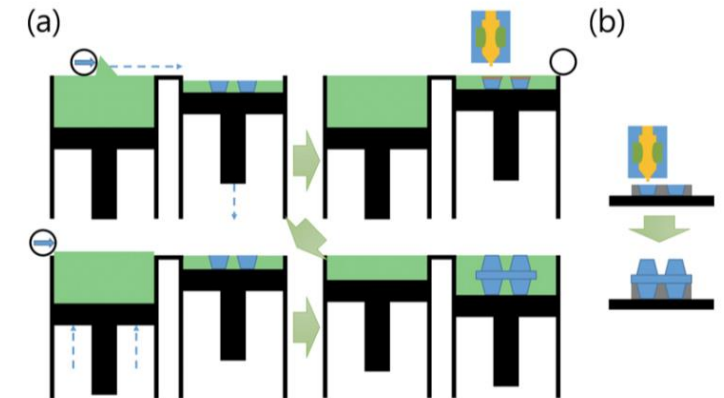
- Beam-scanning (A)
- Image-projection (B)
- Due fotoni (C)



Inkjet

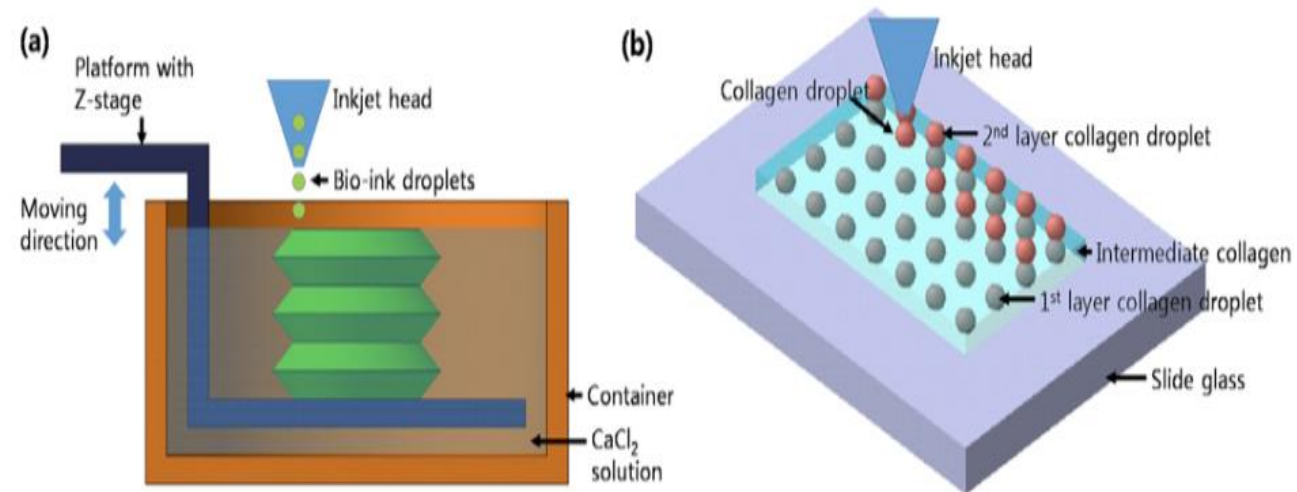
- ▶ Stampa strato su strato di gocce di materiale
- ▶ Vantaggio → disporre le cellule in posizioni desiderate

- ▶ Powder-bed (a)
- ▶ Inkjet diretto (b)



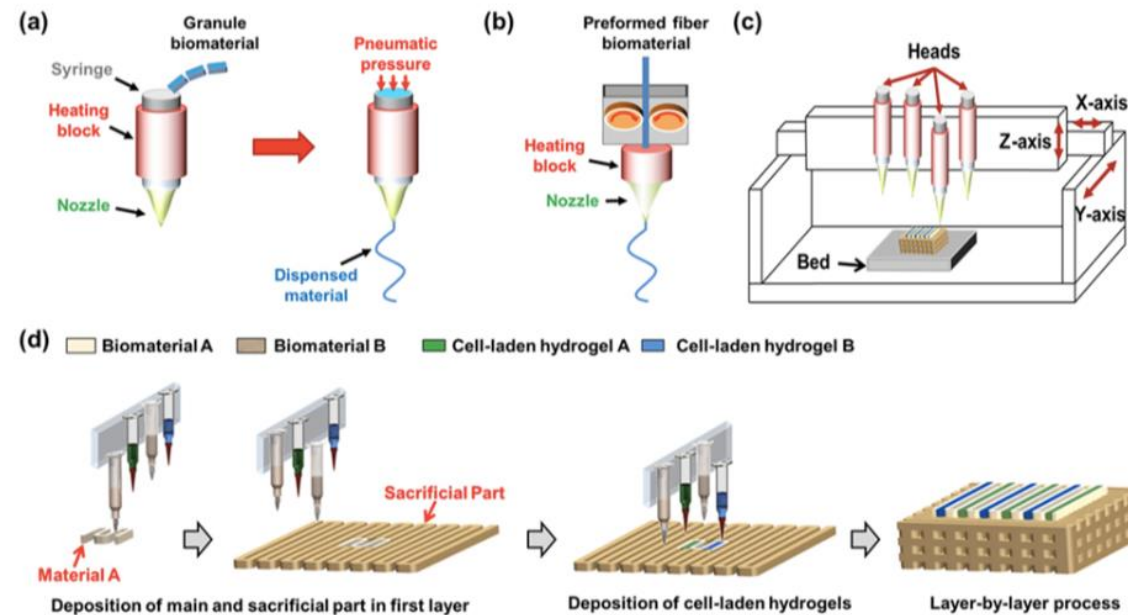
- ▶ Nakamura et al. (2009) → bioink con cellule HeLa in soluzione di alginato di sodio stampato in soluzione di cloruro di calcio

- Xu et al. (a) → costruzione di una struttura a tubo a zig zag composta da fibroblasti
- Moon et al. (b) → deposizione di gel con alta densità di cellule per stampare strutture 3D composte da collagene

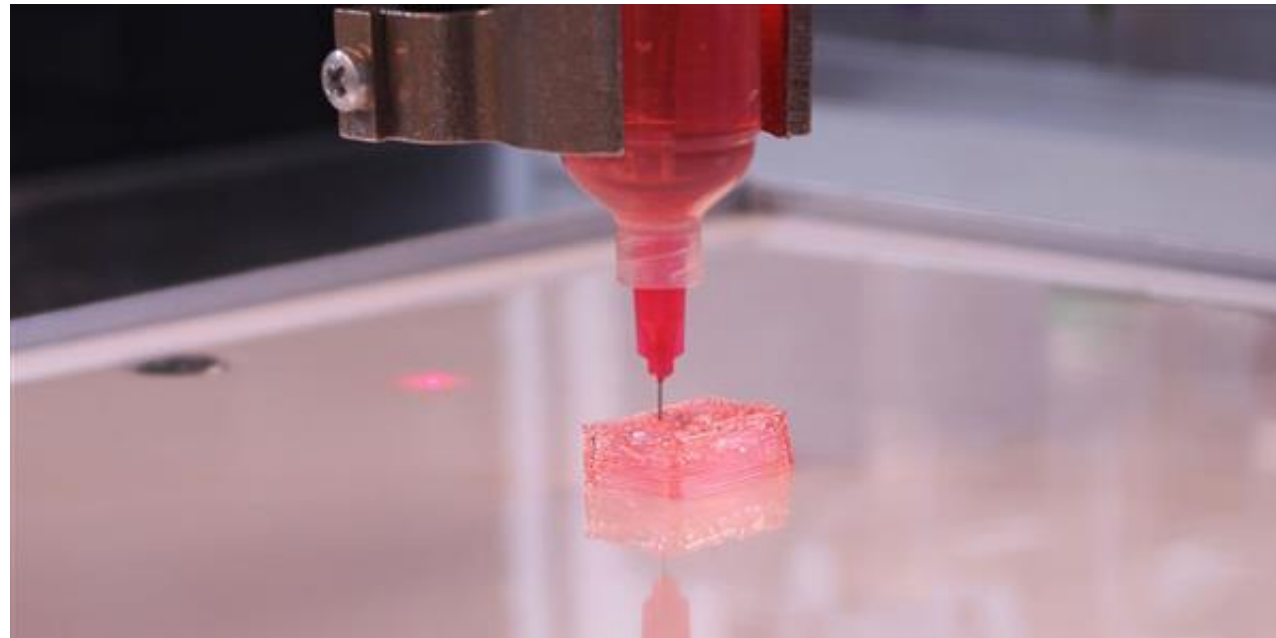


Dispensing

- Deposizione di un materiale fuso estruso da un ugello
- Facilità d'uso e non necessità di un post-processing



- Humacher, Teoh, Zein et al. —→ PCL estruso creando uno scaffold poroso per la rigenerazione di osso e cartilagine;
- Mironov, Forgacs et al. —→ dispenser diretto di cellule per migliore rigenerazione di tessuti nella rete vascolare;
- Schuurman, Federovich, Malda et al. —→ Cellule ,PCL e idrogel stampate per ricreare osso, cartilagine, tessuto osteocondrale.





Materiali
printing

per l'organ



Idrogel

Gli idrogel sono i materiali più utilizzati nel bioprinting.

Sono composti principalmente da acqua (fino a $> 99\%$), e da una rete polimerica idrofila che confina l'acqua.

Vantaggi:

- Possibilità di incapsulare cellule viventi.
- Il microambiente dell'idrogel mima le caratteristiche dei tessuti vivi.

Svantaggi:

- Scarse proprietà meccaniche → sono principalmente utilizzati per l'ingegneria dei tessuti molli.

I polimeri

- I polimeri sono ampiamente utilizzati nell'organ printing, ad esempio negli idrogel e per la costruzione di scaffold, dato che offrono vantaggi in termini di citocompatibilità e proprietà biologiche che sono importanti nell'ingegneria dei tessuti e nella medicina rigenerativa.



I polimeri

► Polimeri naturali

I polimeri naturali sono biomateriali isolati da fonti naturali.

Sono largamente usati per applicazioni biomediche:

- Ottima biocompatibilità → integrazione e crescita cellulare.
- Non causano risposte infiammatorie in un sito di impiantazione.



I polimeri

I polimeri naturali possono essere classificati in

- Proteine (collagene, fibrina)
- Polisaccaridi (alginati, agarosio e chitosani)
- Glicosamminoglicani





I polimeri

Collagene

Principale proteina del tessuto connettivo negli animali e più abbondante nei mammiferi (circa il 25% della massa proteica totale). L'unità strutturale del collagene è rappresentata dal tropocollagene.

Ottime capacità strutturali:

- Rivestimento superficiale
- Creazione di gel per colture di cellule

Vantaggi:

- Velocità di degradazione simile alla velocità di crescita cellulare → spazio per crescita cellulare

Esempio: scaffold stampati in 3d contenenti fosfato di calcio e collagene sono stati utilizzati a livello sperimentale per la rigenerazione ossea.



I polimeri

Fibrina

La fibrina copre un ruolo fondamentale nella guarigione delle ferite e impedisce la perdita di sangue grazie alla creazione di colla di fibrina.

- Si utilizza soprattutto nelle matrici di scaffold per la riparazione di tessuto cartilagineo.

Alginati

Sono polisaccaridi derivati da alghe e formati da due monosaccaridi che si ripetono. L'aggiunta di ioni di calcio forma un idrogel ionotropico utilizzato per l'incapsulamento di condrociti.

- Il vantaggio maggiore derivante dall'utilizzo di questo idrogel è la rapida gelificazione (1s), che assicura stabilità alla struttura stampata.



I polimeri

Chitosani

- ▶ polimeri semicristallini che possiedono una grande biocompatibilità. L'aggiunta di ioni fosfati crea un idrogel ionotropico, che ha la capacità di interagire con fattori di crescita e proteine di adesione e si presenta come gel a temperatura corporea. È utilizzato in bioprinting nella fabbricazione di canali microfluidici tubulari.

Polimeri sintetici

I materiali sintetici hanno due significativi vantaggi:

- ▶ possono essere riprodotti industrialmente su ampia scala
- ▶ permettono un preciso controllo di alcuni parametri come ad esempio peso molecolare, tempi di degradazione, forma e porosità della struttura.



I polimeri

Svantaggi

- mancanza di specifici segnali per consentire il riconoscimento cellulare e quindi interazione indesiderata con l'ambiente biologico.

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

- Policaprolattone (PCL): è una termoplastica con un punto di fusione molto basso, che si lega facilmente ad altri polimeri a viene utilizzato spesso nel bioprinting come componente dello scaffold. I vantaggi sono: non tossico, biocompatibile e degrada tramite idrolisi.
- Acido Polilattico (PLA): è usato per la creazione di scaffold biodegradabili poiché è biocompatibile, biodegradabile e relativamente facile da lavorare. Degrada per idrolisi, ma essendo idrofobico questa è abbastanza lenta. Scaffold di PLA sono utilizzati per la rigenerazione di vari tessuti, quali pelle, cartilagine, nervi e vasi.
- Glicole polietilenico (PEG): è un polimero sintetico idrofilico utilizzato negli scaffold per controllare l'adesione di cellule e proteine allo stesso.



Matrice Cellulare Decellularizzata dECM

- La possibilità di stampare e modellare tutti i componenti che costituiscono un tessuto in tre dimensioni per generare strutture simili ai tessuti è un'emozionante prospettiva di bioprinting.

Problematiche:

la maggior parte dei materiali della matrice utilizzati finora per il bioprinting non può rappresentare la complessità della matrice extracellulare naturale (ECM) e quindi non è in grado di ricostituire le morfologie e le funzioni cellulari intrinseche.

Soluzione:

sviluppo di metodi per il bioprinting di costrutti carichi di cellule con un bioink costituito da matrice extracellulare decellularizzata (dECM) in grado di fornire un microambiente ottimizzato che favorisce la crescita del tessuto in 3 dimensioni.

In particolare si cercano di sviluppare metodi per bioprinting utilizzando matrici decellularizzate di tessuti specifici come tessuto adiposo, cardiaco e cartilagineo, capaci di garantire un ambiente di sviluppo più favorevole e una funzionalità nel lungo termine.



Decellularizzazione

È una procedura che richiede diversi steps consequenziali:

- congelamento del campione, utile per lisare le cellule (rompere la membrana cellulare)
- utilizzo di enzimi e detergenti come l'SDS, sodio dodecil solfato, necessari per garantire un completo distacco tra le cellule e la matrice.
- Risciacquo dei tessuti per rimuovere il detergente
- Liofilizzazione
- La dECM viene macinata in polvere fine



Decellularizzazione

- Alla polvere di dECM viene aggiunta pepsina, che consente la solubilizzazione della polvere di dECM in soluzione acida.
- Dopo 48 ore, la pepsina viene inattivata regolando il pH a 7.4 con soluzione di NaOH. Il PBS (polibutylene succinato) viene aggiunto nella soluzione per aggiustare la concentrazione ionica. Il bioink di dECM viene quindi miscelato con le cellule o usato per ulteriori processi di stampa. Il bioink è caricato nella siringa sterilizzata e installato sulla testina di stampa.
- Il trattamento chimico permette la rimozione degli antigeni sulla superficie cellulare e quindi crea un materiale privo di agenti patogeni.

Svantaggi:

Un protocollo di decellularizzazione naturalmente colpisce anche porzioni di ECM nativo nel processo di rimozione dei detriti cellulari. In particolare, i trattamenti a base di enzimi digeriscono gran parte dell'ECM a base di collagene.



Conclusione sulla dECM

Vari utilizzi della dECM insieme a cellule, biomolecole o farmaci hanno dimostrato la superiorità della dECM per la rigenerazione del tessuto.

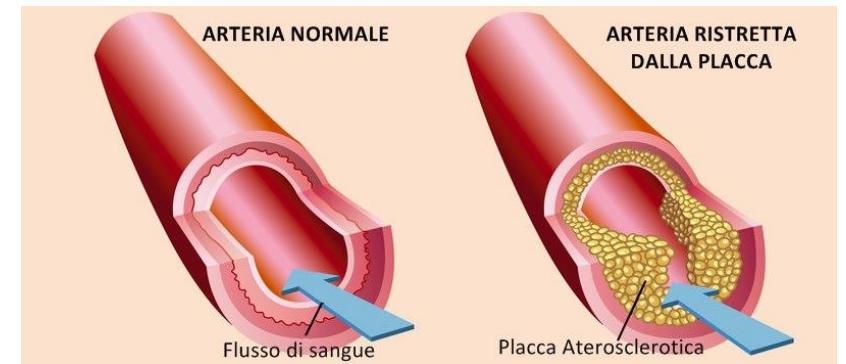
I materiali dECM derivanti da cuore, cartilagine e tessuto adiposo sono stati trattati con successo in bioink stampabile e hanno mostrato un drammatico miglioramento della differenziazione e della maturazione del cellule stampate incapsulate all'interno del bioink sviluppato rispetto al collagene bioink.



Bioprinting tessuto molle

Tessuti molli

Malattie cardiache ischemiche



- Includono molti problemi legati ai processi aterosclerotici.
 - Aterosclerosi: indurimento delle pareti delle arterie con conseguente perdita di elasticità per la formazione di placche → restringimento delle arterie → la circolazione sanguigna più difficile e formazione di coaguli di sangue.
- Strategie disponibili per affrontare l'insufficienza cardiaca ischemica allo stadio terminale:
 - il trapianto di cuore
 - uso di dispositivi di assistenza ventricolare sinistra (LVAD).
- Infarto miocardico
 - Metodo promettente → trapiantare delle cellule nella zona lesa per sostituire il tessuto danneggiato, ma il 50-90% delle cellule iniettate viene perso durante l'erogazione e oltre il 90% delle cellule rimanenti muore entro una settimana dall'iniezione a causa dell'ambiente ipossico.
- Ricerche recenti nell'ingegnerizzazione del tessuto cardiaco
 - Strutture di tessuto cardiaco 3D di tipo patch → Dispositivi sterili, usati per la riparazione o il rinforzo di segmenti parietali dei vasi caratterizzati da particolare fragilità o incisi durante interventi chirurgici
 - possono attenuare la disfunzione ventricolare sinistra ripristinando meccanicamente il miocardio ferito attraverso la semina di un gran numero di cellule, biomolecole e altri materiali biologici.

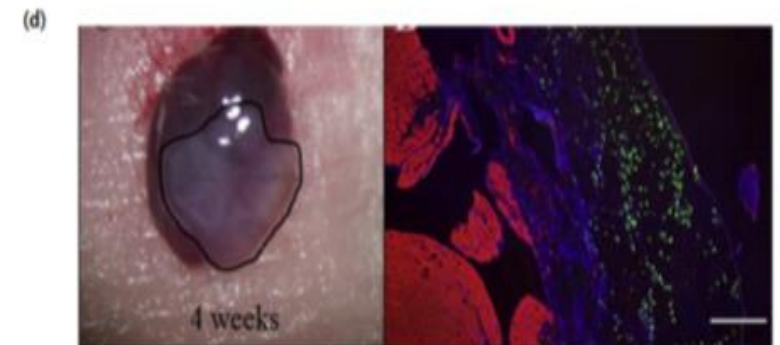
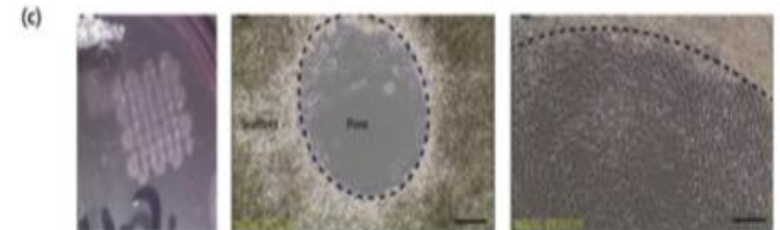
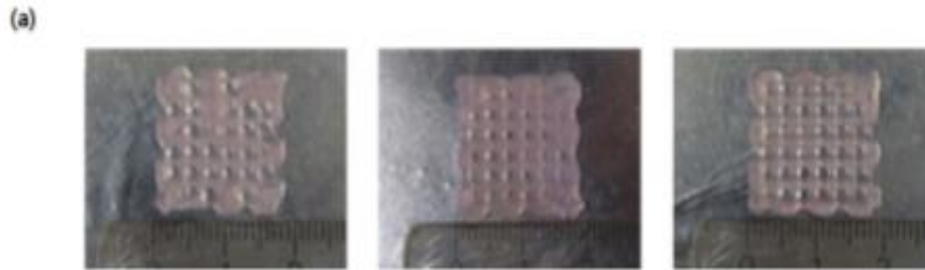


■ Benefici

- riduzione della dimensione dell'infarto attraverso la fornitura di supporto strutturale;
 - rilascio di cellule, biomolecole e citochine secrete dalle cellule incorporate per ridurre l'apoptosi (morte cellulare) e promuovere l'angiogenesi (naturale moltiplicazione dei vasi sanguigni);
 - stimolazione di meccanismi endogeni per promuovere la migrazione cellulare dai cerotti impiantati verso il miocardio ferito.
-
- Strutture 3D di tipo patch possono essere fabbricate usando vari biomateriali, come materiali derivati naturalmente (collagene, fibrina e alginato) e polimeri sintetici.
-
- Vantaggio della stampa → creazione di un'architettura porosa in tutta la struttura interna, in modo che l'ossigeno e i nutrienti possano essere continuamente forniti.
-
- Obiettivo → generazione di grandi quantità di volume con alte percentuali di consumo di ossigeno. Ad esempio, un innesto di tessuto vascolare può ospitare circa $2,8 \times 10^5$ cellule mL^{-1} senza fenomeni ipossici dopo il trapianto. Tuttavia, il tessuto cardiaco fisiologico ha una densità di cardiomiociti 70 volte maggiore.

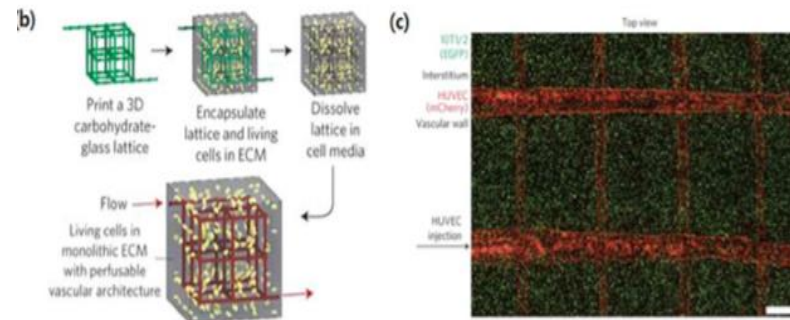
Esperimento di Gaetani

- Stampa 3D di cellule progenitrici di cardiomiociti umani (hCMPC) con alginato e strutture a forma di reticolo stampato per creare pori (a)
- Primo passo per sviluppo di un costrutto cardiaco stampato, ma è necessaria una maggiore considerazione degli effetti delle diverse componenti ECM e delle modifiche dei fattori di crescita.
- Miscela di idrogel di acido ialuronico e gelatina (HA / Gel) per valutare il potenziale terapeutico di un cerotto cardiaco stampato in 3D composto da hCMPC
 - miglioramento dell'attaccamento e della proliferazione cellulare
 - cellule del costrutto stampato hanno conservato in vitro la capacità di differenziazione cardiaca fino ad un mese (c,d).
- Dopo l'impianto del costrutto, il rimodellamento del ventricolo sinistro è stato attenuato e la funzione cardiaca è migliorata in modo significativo. Questo studio ha evidenziato i benefici del metodo di stampa ottenuto mediante semina di cellule direttamente sul sito danneggiato.



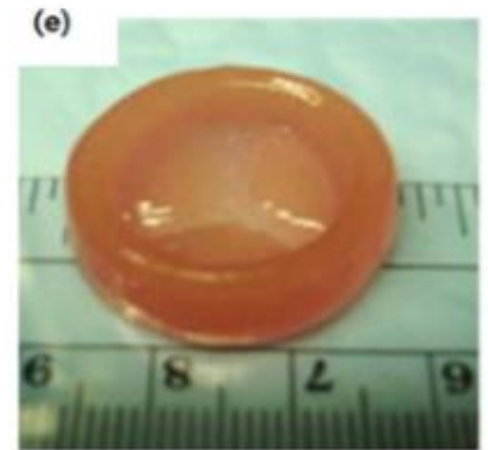
Stampa della vascolarizzazione nei tessuti ingegnerizzati

- Garantire una sufficiente vascolarizzazione del costrutto ingegnerizzato per la sua sopravvivenza a lungo termine.
- Due approcci per stampare la vascolarizzazione nei tessuti ingegnerizzati:
 - stampa indiretta usando materiali che producono una rete vascolare.
 - stampa diretta di una rete vascolare usando fonti di cellule endoteliali.
- Recenti studi hanno dimostrato l'uso di un bioink per creare canali vascolari.
- Miller et al. ➔ Stampa di una rete 3D composta da biogas idrosolubile a base di materiali carboidrati per la colata rapida di reti vascolari modellate in 3D per tessuti di grandi volumi (b, c).
 - Rivestirono la rete vascolare fabbricata con un polimero biocompatibile non lubrificato e poi sono state gettate in un idrogel cellule epiteliali. Dopo aver lavato il biogel e i fluidi attraverso il canale cavo, i pannelli incapsulati nel 3DECM hanno mostrato una raffinata lucentezza e funzionalità.
- La stampa di una rete vascolare diretta è ancora in fase di sviluppo come concetto. Numerosi nuovi risultati, come la coltura con cellule endoteliali o fibroblasti, il rilascio di fattori di crescita angiogenici hanno dimostrato la possibilità di utilizzare la formazione capillare nei costrutti di tessuto cardiaco 3D. Con questi sviluppi di successo, i capillari vengono coltivati all'interno di un costrutto di tessuto ingegnerizzato; ma le venule capillari di solito conducono il sangue molto lentamente. Quindi, una sfida successiva sarà l'ingegnerizzazione degli approcci per ottenere una formazione arteriosa in un costrutto di tessuto cardiaco 3D.



Valvola cardiaca

- Regola il flusso di sangue ossigenato diretto ai vari tessuti e organi del corpo. I suoi problemi richiedono metodi di trattamento avanzati.
- Le valvole cardiache tissutali hanno un enorme potenziale per la cura delle malattie delle valvole cardiache, ma devono essere superati molti ostacoli in relazione alle fonti cellulari e ai materiali attraverso sforzi multidisciplinari.
- Hockaday et al. → Fabbricazione di una valvola aortica che mostrava una complessa anatomia 3D ed eterogeneità usando bioinks polietilenglicol-diacrilato (PEG-DA), integrati con bioink alginato (d).
 - Elevata precisione geometrica
 - Cellule interstiziali seminate sopravvissute fino a 21 giorni
 - Modulo elastico da 5,3 a 74,6 kPa.
- Duan → utilizzo di più bioink biocompatibile come acido ialuronico metacrilato (Me-HA) e gelatina metacrilata (Me-Gel) per la realizzazione di una struttura valvolare a celle 3D (e).
 - La precisione di stampa dipendeva dal rapporto tra Me-Gel e Me-HA e la forma della valvola è stata replicata con successo utilizzando una combinazione ottimizzata dei due materiali.





Arterie coronarie

- Le patologie delle arterie coronarie vengono gestite attraverso
 - terapia farmacologica
 - intervento coronarico percutaneo
 - bypass coronarico (CABG) operazione necessaria in presenza di una coronaria bloccata od occlusa, durante la quale il chirurgo, utilizzando una sezione della safena dalla gamba o un'arteria dal torace del paziente (mammaria) crea una nuova via affinché il sangue ben ossigenato raggiunga il cuore.
 - politetrafluoroetilene (ePTFE; Gore-Tex) e il tessuto di polietilentereftalato (PET; Dacron)
- Limitazioni all'uso di questi innesti:
 - proprietà meccaniche improprie
 - basse affinità biochimiche.
- L'innesto vascolare tessuto-progettato deve essere non trombogenico ed endotelializzato e deve fornire proprietà biomeccaniche simili a quelle del vaso sanguigno nativo.
- Norotte et al → creazione di costrutti di tessuti ingegnerizzati senza scaffold utilizzando la tecnologia di biostampa 3D.
 - Stampa di aggregati cellulari in una posizione desiderata;
 - cellule autoassemblate in modo naturale in forme cilindriche;
 - nuovo modo di progettare vasi di forme distinte e alberi gerarchici con elevata controllabilità.

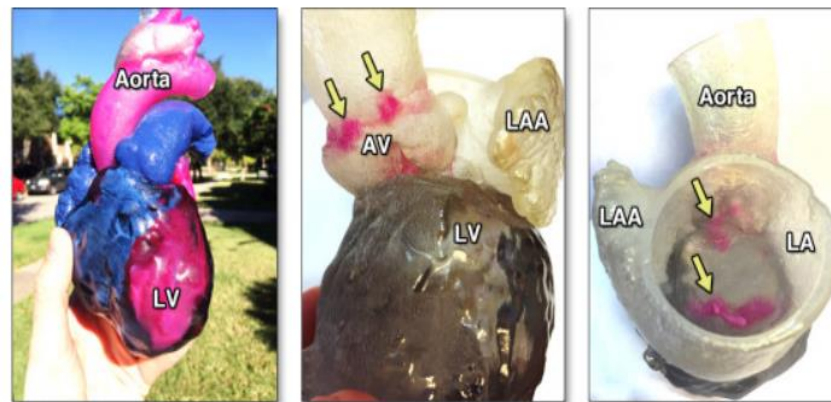


Applicazioni cardiovascolari

- Modelli specifici per il paziente stampati in 3D possono essere creati per una serie di applicazioni:
 - creazione di strumenti di insegnamento anatomico;
 - sviluppo di modelli funzionali per indagare il flusso intracardiaco;
 - creazione di modelli deformabili di materiale miscelato per la pianificazione procedurale complessa.

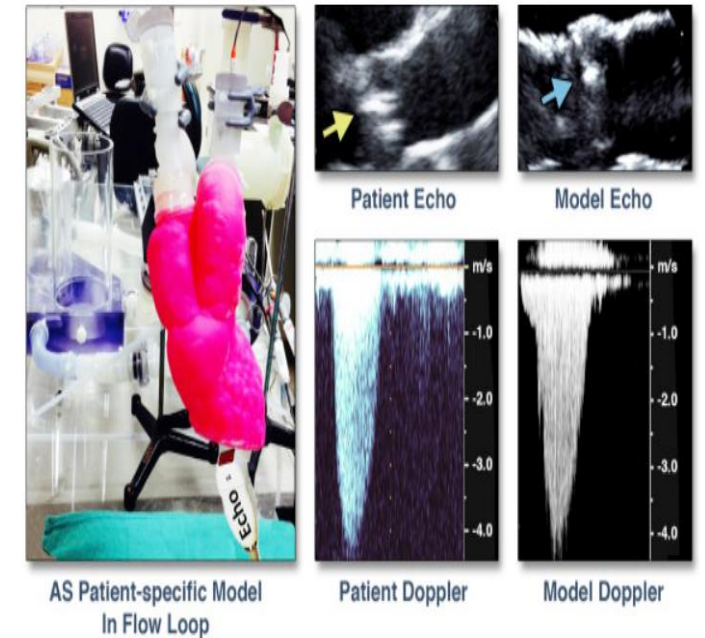
Strumenti per l'insegnamento

- Una prima applicazione della modellazione della stampa.
- Come i modelli di cuore in plastica familiari alla maggior parte degli operatori sanitari, un modello stampato in 3D può trasmettere rapidamente una complessa disposizione anatomica, ma ha il valore aggiunto di rappresentare anche la patologia anatomica specifica del paziente.
- Esempi includono modelli educativi che descrivono difetti cardiaci congeniti, stenosi valvolare, e procedure di impianto o riparazione di valvole. Sempre più spesso, questi modelli 3D possono essere costruiti con colori particolari.

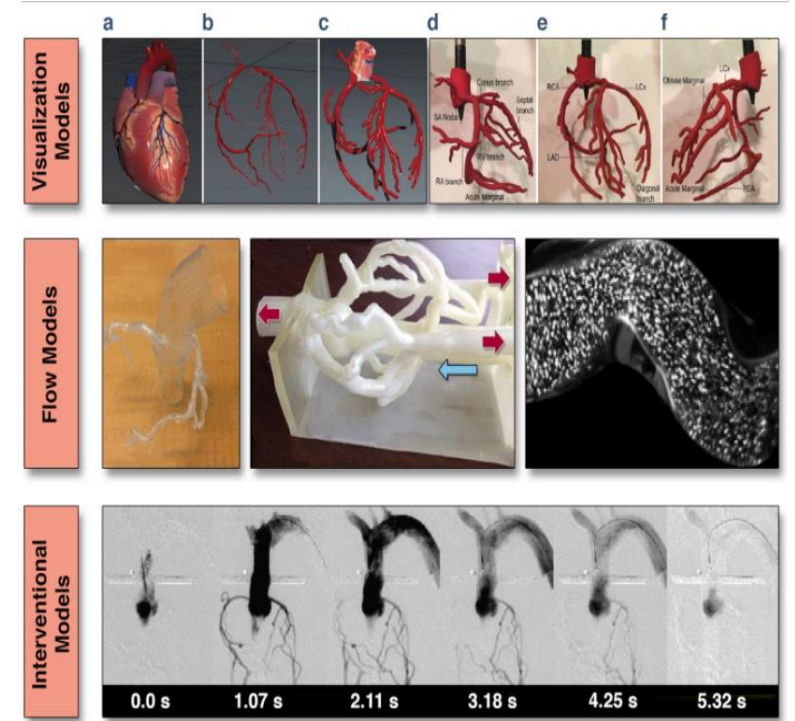


Modelli di flusso funzionale

- Disfunzione della valvola aortica (condizioni recentemente ricreate e accoppiate con fantoccio di flusso) → modelli tramite CT, CAD e stampa 3D multimateriali
- Severa stenosi della valvola aortica (AS) configurazione valvolare statica → set di dati CT per acquisire il dettaglio anatomico specifico del paziente della radice aortica, compresa l'area dell'orifizio della valvola e la deposizione di calcio regionale.
- Un recente rapporto ha descritto la creazione di 8 modelli 3D multimateriali specifici per pazienti colpiti da grave AS. Ogni modello ha replicato bene la specifica geometria anatomica con una riproduzione fedele della deposizione di calcio e ispessimento della cuspide.
- La valutazione funzionale di ciascun modello mediante Doppler ha suggerito che l'area della valvola aortica calcolata potrebbe non avere sempre un valore fisso.
- Per alcuni pazienti, l'area dell'orifizio valvolare del modello funzionale variava con l'aumentare del volume del flusso.

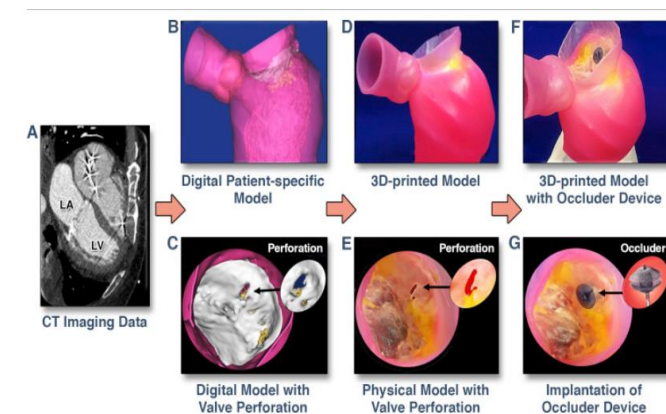
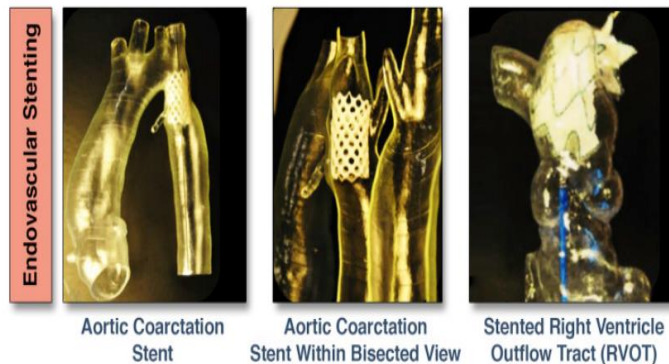


- È stata recentemente riportata la modellazione del letto dell'arteria coronaria per diverse applicazioni.
- La stampa 3D di strutture coronariche può consentire la visualizzazione di regioni stenotiche, che possono servire come strumento da banco per praticare procedure interventistiche all'interno di un ambiente di loop con flusso pulsante.
- L'albero dell'arteria coronaria può essere chiaramente definito con metodi CT e quando il 3D viene stampato in fase diastolica, questi modelli possono essere accoppiati ad un loop di flusso pulsante per replicare la perfusione coronarica epicardica.
- Quando i modelli vengono stampati da materiali otticamente trasparenti, tecniche come la velocimetria dell'immagine delle particelle consentono la visualizzazione diretta di dinamiche di flusso complesse (come si nota in figura).
- Oltre agli studi sul flusso, questi modelli funzionali possono essere utilizzati per simulare le procedure interventistiche. La figura mostra un angiogramma di simulazione.



Pianificazione procedurale

- Le malattie cardiovascolari congenite sono spesso associate a geometrie complesse che possono essere molto difficili da apprezzare appieno dalle immagini TC o ecocardiografiche. Un'ampia gamma di anatomie cardiache congenite complesse è stata ricostruita e stampata in 3D per migliorare la pianificazione chirurgica, inclusi il ventricolo destro a doppia uscita, il difetto del setto atriale (ASD), la tetralogia di Fallot e la sindrome del cuore sinistro ipoplasico.
- È stata stampata in 3D una coartazione aortica precedentemente stentata prima di un intervento.
- Oltre all'imaging avanzato utilizzato per la caratterizzazione delle neoplasie intracardiache (ecocardiografia e TC), è stato dimostrato che i modelli 3D stampati specifici per il paziente sono utili nella gestione chirurgica preoperatoria e intraoperatoria delle escissioni tumorali cardiache.
- Poiché i tumori cardiaci possono estendersi alle pareti del miocardio o alle strutture valvolari, la loro resezione radicale e completa è raramente possibile. Diverse relazioni hanno dimostrato che le conoscenze acquisite con la modellazione 3D stampata influenzavano positivamente la strategia chirurgica per la gestione dei tumori intracardiaci. Questo valore aggiunto dei modelli stampati in 3D era basato sulla capacità di rappresentare chiaramente l'interazione del tumore con il tessuto circostante.





Prospettive future

- Attualmente la tecnologia si sta spostando verso applicazioni più all'avanguardia come la creazione di una membrana elastica in morbido silicone sagomata per adattarsi allo strato esterno della parete del cuore, contenente sensori che misurano il pH o l'acidità, la temperatura e la deformazione meccanica o erogano impulsi elettrici.
- Finora, i ricercatori hanno stampato in 3D, dal tessuto vivente (ma non necessariamente umano), sezioni di muscolo cardiaco, condotti delle valvole e vasi sanguigni, che potrebbero presto essere disponibili per i pazienti come sostituti delle parti danneggiate.
- Forse necessari diversi decenni prima che i cuori viventi stampati in 3D siano disponibili per il trapianto, in gran parte a causa della complessità delle strutture che devono essere replicate.
- Al momento il principale svantaggio della maggior parte degli studi di ingegneria tissutale risiede nel fatto che la dimensione del cuore umano rende questi approcci non controllabili, sia per le dimensioni della matrice che per il numero limitato di cellule che possono essere effettivamente impiantate.
- Per migliorare l'ingegnerizzazione del tessuto cardiaco è quindi necessario:
 - Determinare quale tipo di cellula (cellule adulte, cellule embrionali o cellule staminali pluripotenti indotte, autologhe o eterologhe) è più adatto per ottenere la rigenerazione dei tessuti.
 - Definire quali matrici (idrogel naturale o sintetico, collagene, acido polilattico) sono in grado di annidare meglio la popolazione cellulare e favorirne la conservazione e la proliferazione.
 - Verificare l'esistenza dell'accoppiamento elettromeccanico delle cellule all'interno della matrice e del costrutto con il tessuto per ripristinare la funzione cardiaca.
 - Verificare la vascolarizzazione del costrutto che determinerà la propria vitalità e integrazione con il tessuto ricevente.

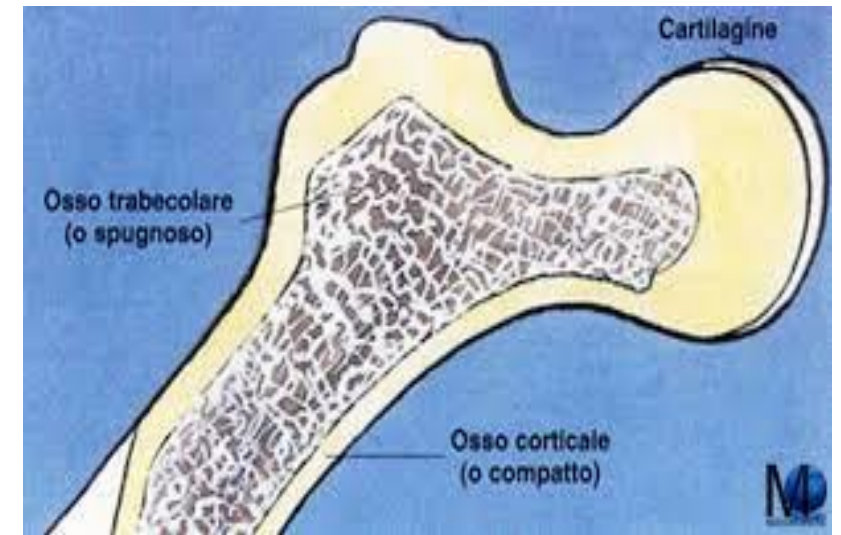


Bioprinting osseo

Bioprinting osseo

Anatomia dell'osso

- Funzioni:
 - fornire una struttura al corpo;
 - resistenza meccanica;
 - regolazione del pH ematico;
 - mantenimento dei livelli di calcio e fosfato nei processi metabolici.
- L'osso è costituito da diverse strutture:
 - Osso spongioso
 - Osso corticale
- Entrambi i tipi di osso subiscono rimodellamento e maturazione controllati dalle interazioni tra:
 - Osteoblasti
 - Osteoclasti
 - Osteociti

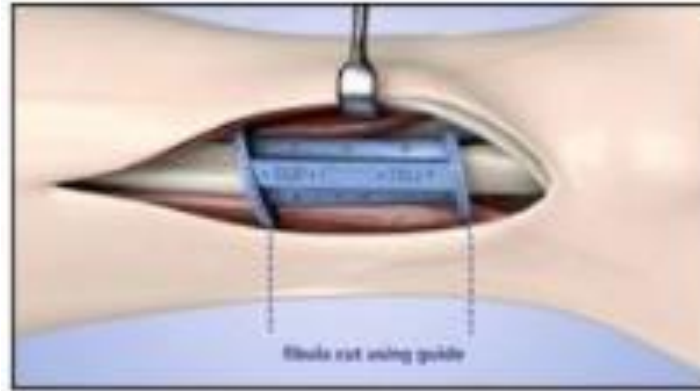


Patologie riguardanti il tessuto osseo

- Un difetto risultante da un trauma grave, una mancata aderenza dopo la frattura, la rimozione di un tumore, infezioni o anomalie congenite possono guarire da sole o possono portare a deformità, lasciando i pazienti con ridotta struttura ossea e riducendo la loro funzionalità.



Prime soluzioni alle malattie



- L'osso è il secondo osso più trapiantato dopo il sangue. Può esserci un trapianto
 - Autologo: proveniente dal paziente stesso. In alcuni casi quanto la sua qualità di prelievo è troppa non si può fare.
 - Eterologo: proveniente da cadaveri o da animali. Tessuto osseo dai cadaveri viene congelato in strutture apposite a -80°C . L'osso mantiene la sua capacità osteoinduttiva (sintesi del nuovo osso viene attivata) e osteoconduttiva (funge da struttura tridimensionale passiva)
 - Protesi ortopediche: è caratterizzata da una struttura di tipo scheletrico portante, e da eventuali elementi articolari.



Necessità della stampa 3D delle ossa

- Sempre più richiesta di sostituzione di anche, ginocchia, spina dorsale (queste protesi avevano vita di soli 15 anni).
- Le differenze strutturali delle ossa e dei diversi siti del corpo suggeriscono necessità di metodi alternativi al trapianto.
- Sempre più richiesta di sostituzione ossea, che i metodi attuali non riescono a fronteggiare
- Gli impianti stampati in 3D potrebbero durare più a lungo.
- Gli impianti 3D vengono costruiti appositamente per le caratteristiche del paziente.
- La superficie dell'impianto stampato in 3D subisce forse di carico uniformi perché la superficie porosa si riempie di osso vivo.
- Le stampanti 3D consentono la produzione di strutture ossee di diverse geometrie, scalabilità e porosità.



Caratteristiche ideali del supporto osseo

- Biocompatibilità: Supportare attività cellulari come la proliferazione cellulare, differenziazione, formazione della matrice extracellulare. Capacità di essere incorporato nell'osso ospite per indurre formazione dei vasi all'interno e intorno al sostituto osseo.
- Proprietà meccaniche: deve essere in grado di sopportare forze di carico in vivo.
- Corretta architettura interna: Dovrebbe avere un'architettura porosa interconnessa per una sufficiente diffusione delle sostanze nutritive con pori di dimensione 200-350 μm per permettere la crescita del tessuto osseo.
- Biodegradabilità: In una situazione ideale il sostituto dovrebbe essere in grado di degradarsi in corrispondenza di una crescita di nuovo tessuto osseo.



Prime pratiche



- Klammert et al. → fabbricazione di scaffold 3D per dimostrare la capacità di ricostruzione di difetti cranici. File CAD generato dalla scansione di cadavere umano
- Tada et al. → fabbricazione di impianti per la ricostruzione delle deformità facciali utilizzando dati tridimensionali del paziente. Modelli personalizzati aiutano ad ottimizzare i difetti complessi.
- Seitz et al. → studio della fattibilità della fabbricazione di scaffold con strutture interne complesse e ad alta risoluzione utilizzando un legante polimerico solubile di acqua. Hanno mostrato che la fabbricazione di scaffold cilindrici con canale fino a 450 μm consentiva l'osteointegrazione

Cosa è stato messo in pratica?

- ARIZONA (2013): paziente con tumore osseo canceroso all'articolazione dell'anca. Soluzione possibile disponibile: rimozione dell'anca.
- Il chirurgo realizzò un modello in argilla per adattarsi alla forma anatomica e questa è stata convertita in modello CAD e stampata in titanio.
- Nella stessa clinica vengono realizzate strutture in 3D per poter spiegare meglio le diagnosi ai pazienti e famiglie



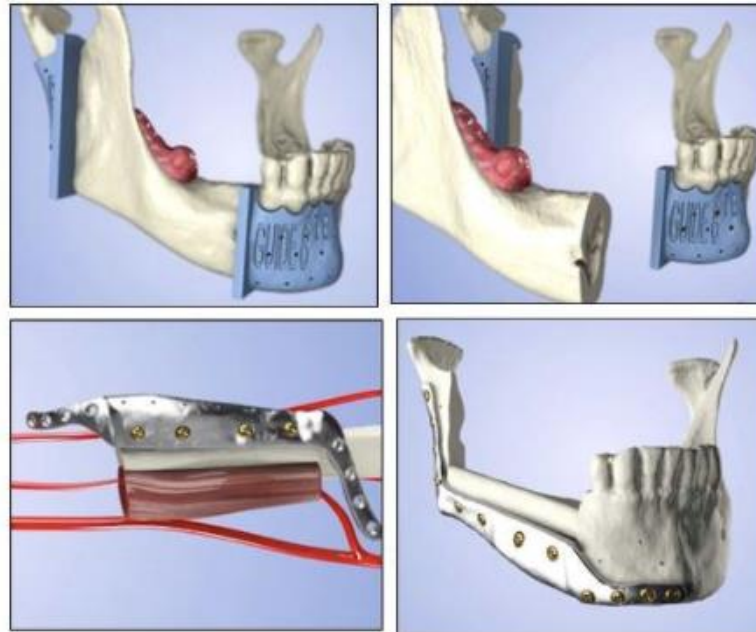
Cosa è stato messo in pratica?

- ▶ INDIA (2017): paziente con tubercolosi alla colonna vertebrale.
- ▶ Realizzate 3 vertebre di 3cm di lunghezza in titanio, progettata specificatamente per la paziente. Struttura microporosa per consentire la crescita cellulare
- ▶ Impianto testato per la biomeccanica e le alzate di stress



Cosa è stato messo in pratica?

- GALLES (2017): combinazione tra innesto osseo e impianto in titanio stampato in 3D.
- L'osso prelevato dal perone viene impiantato nella mascella ma non permette l'innesto dell'impianto dentale.
- Viene stampato in 3D per essere fissato l'impianto in maniera estetica e permettere l'impianto dentale



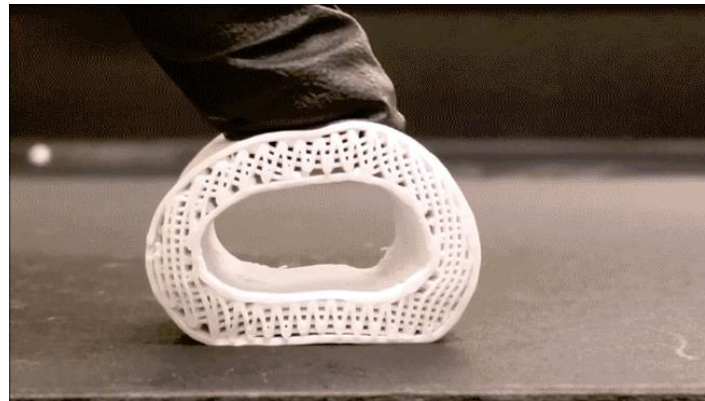


Prospettive future

- Sviluppo di scaffold in ceramica porosa e superamento delle basse resistenze meccaniche che li rendono inadatti ai carichi elevati.
- Approccio dell'impalcatura ceramica più forte e meno duttile, ma la differenze tra le strutture dell'osso corticale e trabecolare richiedono materiali da sviluppare
- Sviluppo di strutture artificiali che siano unione tra modellazione e progettazione personalizzati
- Speranza di poter utilizzare come 'cartuccia' della stampante 3D un composto mescolato tra materiale umano e materiale plastico e titanio

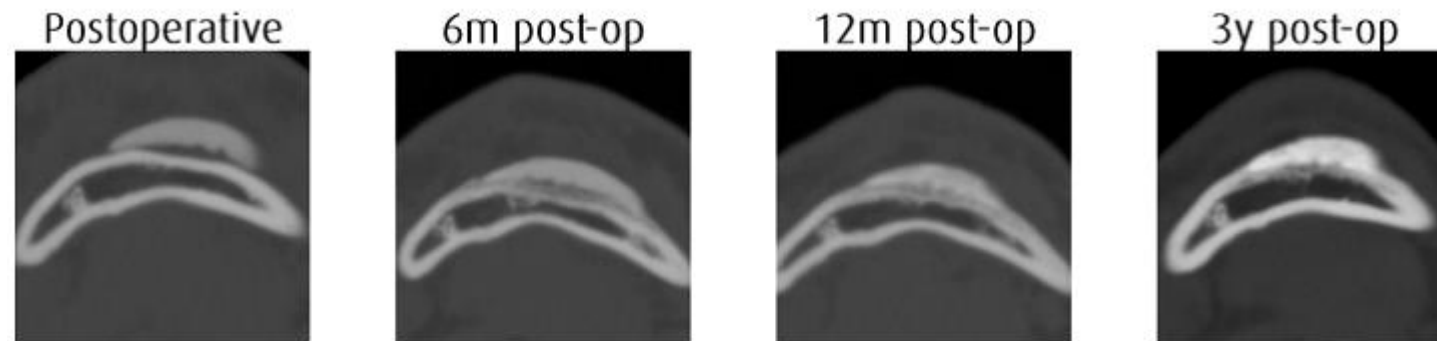
Prospettive future

- In fase di sperimentazione è l'osso iperelastico (HB). Impiantato come impalcatura del nuovo osso o a sostituire materia ossea persa.
 - Costituito principalmente da idrossiapatite.
 - Viene inserito pressandolo nelle aree dove manca materiale osseo.
 - E' poroso quindi favorisce crescita dei vasi sanguigni
 - Negli esperimenti sui topi si è integrato perfettamente con il tessuto osseo senza infezione
 - Posizionando cellule staminali umane in queste strutture sono cresciute senza difficoltà in poche settimane



Prospettive future

- CT-BONE è un impianto di fosfato di calcio stampabile in 3D.
 - Impiantato specificamente in 23 pazienti con deformità ossee facciali.
 - Deve essere osservata fino a 7 anni e 3 mesi
 - Fino ad ora (dopo 3 anni) non ha mostrato grossi cambiamenti di posizione
 - Solo in 4 pazienti è stata rimossa a causa di infezioni gravi.
 - Impiantata per sperimentazione in Giappone.
 - Stanno partendo le pratiche per poterlo commercializzare in tutto il mondo.



Follow-up using a CT-scan of the bony fusion of a CT-Bone® chin implant



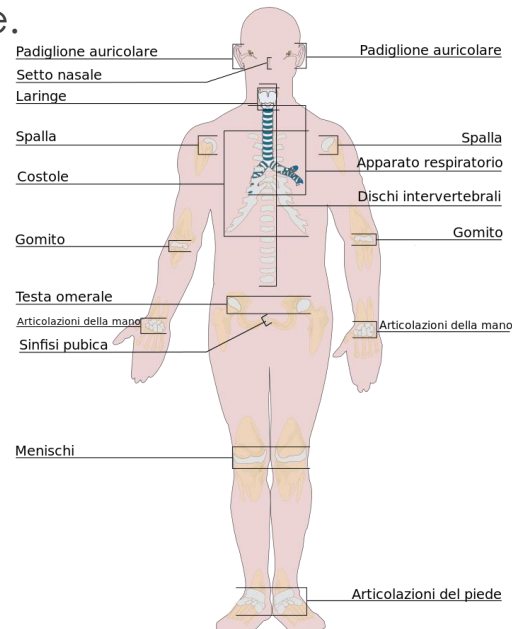
Bioprinting del tessuto cartilagineo

Tessuto cartilagineo

Forma specializzata di tessuto connettivo dotato di specifiche proprietà meccaniche:

- Grande **resistenza** alla tensione
- **Flessibilità**
- **Elasticità**

Il corpo umano possiede tessuti cartilaginei in diverse aree, tra cui naso, orecchie, articolazioni, vie aeree, dischi intervertebrali e costole.



Tre tipi di cartilagine:

- **Cartilagine ialina:** Differenziazione delle cellule mesenchimali che costituiscono i centri di condificazione, le cui cellule, i condroblasti, secernono una matrice e sintetizzano le fibre collagene
- **Cartilagine fibrosa:** Le cellule mesenchimali si differenziano prima in fibroblasti, che sintetizzano fibre collagene di tipo I e in seguito si differenziano in condroblasti che secernono la matrice
- **Cartilagine elastica:** Si origina dalla cartilagine ialina, questa sintetizza prevalentemente molecole di tropoelastina che formano elastina, la quale aggregandosi alla fibrillina forma le fibre elastiche

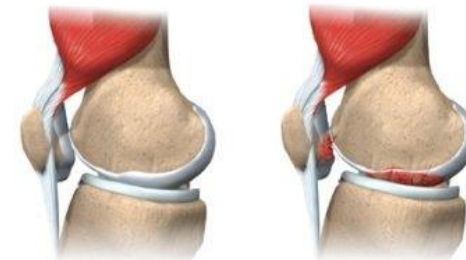
Tessuto cartilagineo

Tale tessuto è costituito da

- **Condrociti:** sono le uniche cellule all'interno della cartilagine, sintetizzano e secernono la ECM e sono accolti in cavità di quest'ultima denominate lacune
- **Matrice extracellulare:** composta da fibre di collagene o elastiche immerse in una matrice amorfa. La matrice amorfa, a differenza della matrice dei tessuti connettivi propriamente detti, risulta solida e contiene al suo interno collagene, proteoglicani, che danno resistenza alla compressione, e piccole quantità di svariate glicoproteine.

Funzioni della cartilagine:

- Sopportare sollecitazioni meccaniche senza deformarsi in modo permanente
- Fornire sostegno ai tessuti molli
- Fornisce alle articolazioni una superficie ammortizzante atta agli scorrimenti, facilitando in tal modo i movimenti delle ossa
- Permettere lo sviluppo e l'accrescimento delle ossa lunghe, sia prima che dopo la nascita



Articolazione sana

Usura della cartilagine



Degenerazione del tessuto cartilagineo

L'invecchiamento, la malattia e le lesioni del tessuto cartilagineo portano ad un'ulteriore degenerazione oltre a quella fisiologica.

- Il tessuto è **privo di vasi sanguigni** e viene nutrito per mezzo della diffusione di sostanze nutritive dal tessuto connettivo adiacente o dal liquido sinoviale contenuto nelle cavità articolari. I condrociti, come conseguenza dell'assenza di vasi, mostrano un'attività metabolica ridotta.
- A causa della sua avascolarità, la cartilagine ha una **limitata capacità di autoriparazione**

Soluzioni attuali:

- **Espianto** di cartilagine sana dal paziente, modellazione e reimpianto nella zona lesionata
 - Scarsa disponibilità di cartilagine
 - Difficoltà di modellare la struttura
- **Protesi** in metallo e in materiale polimerico

L'ingegneria tissutale e il bioprinting sono un'alternativa valida rispetto a queste soluzioni cercando di superarne i limiti e di garantire al paziente elevata qualità di vita

Rigenerazione del tessuto cartilagineo

Scarsa capacità di autoriparazione



Preservazione della cartilagine durante i processi di riparazione

Le attuali strategie di riparazione della cartilagine del ginocchio comportano una procedura di rimozione del tessuto cartilagineo sano intorno al sito della lesione per creare difetti artificiali per i trattamenti o impianti. Questo però può portare alla degenerazione della cartilagine e al fallimento del tessuto impiantato

La fabbricazione di scaffold su misura mediante stampa 3D è una buona strategia di intervento per una lesione cartilaginea senza ulteriore rimozione di regioni sane

La struttura impiantata con una forma specifica deve costituire un tessuto simile alla cartilagine nativa, essere ben integrata con quella ancora esistente.

I punti chiave di questo approccio sono:

- Selezione delle fonti cellulari
- Costruzione di scaffold ottimali

Selezione della sorgente cellulare

La produzione di ECM specifica per il tessuto cartilagineo è il fattore più importante e deve essere considerato per la differenziazione cellulare verso il fenotipo desiderato

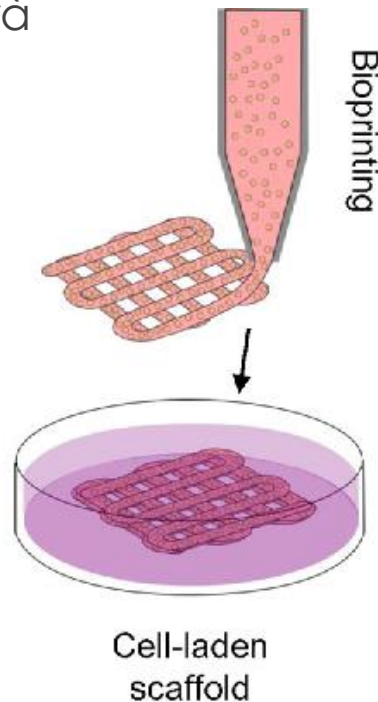
- I **condrociti autologhi** hanno un fenotipo condrocitario ideale. Vengono isolati da varie fonti, e danno origine a tessuto cartilagineo avente le caratteristiche del suo tessuto originale. Per la riparazione della cartilagine articolare, è quindi più appropriato usare cartilagine ialina

- Le **cellule staminali mesenchimali** (MSC) presentano buona disponibilità e elevata capacità di espansione in vitro. Sono principalmente isolate dal midollo osseo o dal tessuto adiposo. Le MSC hanno la capacità di costituire unità formanti colonie di fibroblasti, e un alto potenziale di differenziarsi

Co-culture di MSC e condrociti hanno esibito modulo di Young, moduli dinamici, livelli di glicosaminoglicani e contenuto di collagene significativamente più elevati rispetto ai costrutti seminati con solo MSC o condrociti

Selezione del materiale per lo scaffold

Gli scaffold per la riparazione della cartilagine hanno come scopo quello di costituire una struttura confortevole che induca le cellule alla formazione di nuova matrice extracellulare e funga lei stessa da matrice fino a quando il tessuto non si sarà formato



Lo scaffold ideale deve possedere le seguenti caratteristiche:

- **Biocompatibilità** per minimizzare la risposta del tessuto circostante
- **Velocità di biodegradazione** abbinata alla quella di formazione
- **Porosità** che permetta la diffusione dei nutrienti e dei prodotti di scarico
- **Apporto adeguato di nutrienti** e ossigeno per le cellule
- **Componenti biologici** per la differenziazione condrogenica
- **Proprietà meccaniche** adeguate a sopportare la crescita di tessuto

Selezione del materiale per lo scaffold

► Scaffold naturali:

Idrogel a base di collagene sono usati per imitare l'ambiente biochimico del tessuto nativo. Gli idrogel hanno reti idrofiliche 3D che possono contenere il 10-20% di acqua, consentendo la diffusione di soluti e nutrienti nelle cellule. Inoltre forniscono un microambiente per una differenziazione condrogenica efficiente delle MSCs o dei condrociti.

Tuttavia, la struttura reticolata presenta una scarsa resistenza meccanica per il mantenimento di carichi fisiologici o esterni a lungo termine

► Scaffold sintetici

Diversi polimeri sintetici biodegradabili, come il poli(L-lattide) (**PLLA**), l'acido poliglicolico (**PGA**), l'acido poli(lattico-co-glicolico) (**PLGA**) e policaprolattone (**PCL**), sono utilizzati per fornire migliori proprietà fisiologiche e biomeccaniche. Le proprietà meccaniche e la velocità di biodegradazione possono essere facilmente manipolate in base agli specifici tessuti target. Ulteriori trattamenti biochimici o immobilizzazione di idrogel permettono una migliore formazione del tessuto cartilagineo

Stampa 3D per la realizzazione di scaffold

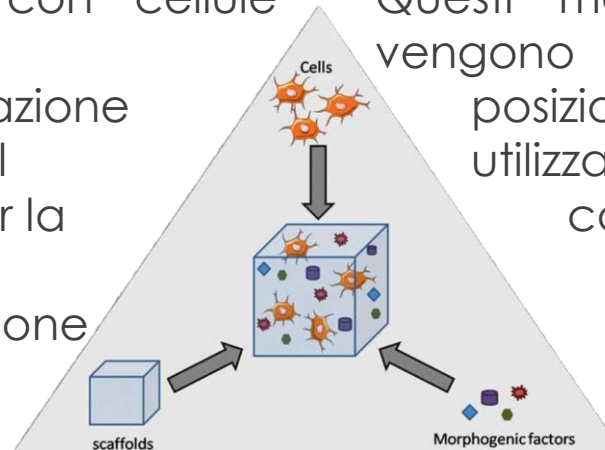
Gli scaffold vengono fisicamente o biochimicamente integrati con componenti aggiuntivi specifici della cartilagine, come fattori di crescita, idrogel e biostimoli.

Sono stati fatti notevoli progressi nelle tecniche di stampa 3D per l'ingegneria tissutale, consentendo la fabbricazione di uno **scaffold ibrido** composto da polimero sintetico come struttura di supporto e un idrogel con cellule incapsulate.

L'idrogel permette la formazione del tessuto cartilagineo, e il polimero offre supporto per la forma originale e controlla la velocità di biodegradazione e la resistenza meccanica

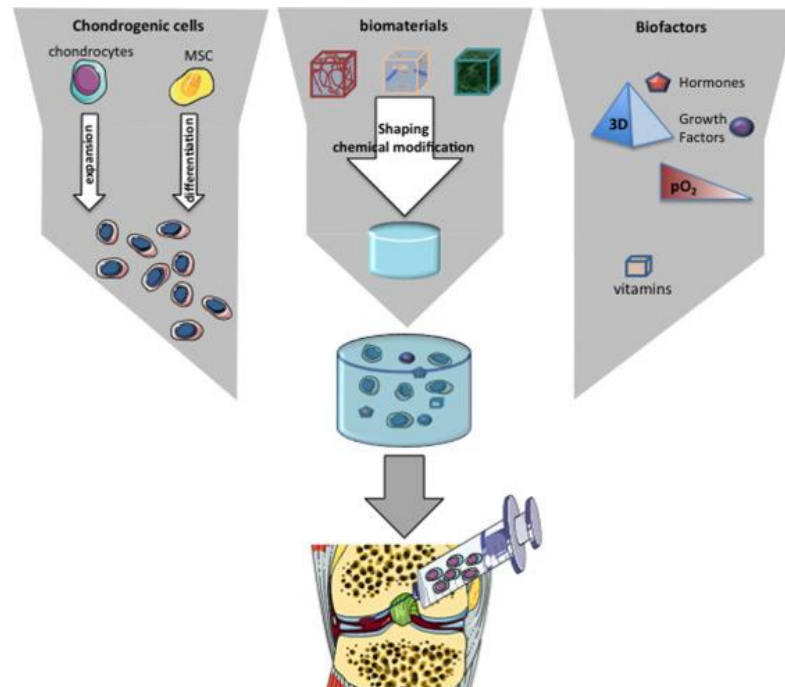
I **sistemi di deposizione multitestata** consentono di fabbricare scaffold tridimensionali con celle, mediante la deposizione strato per strato di policaprolattone (PCL) e una soluzione di alginato con condrociti incapsulati. I gel di PCL-alginato contenenti fattore di crescita (TGF β) mostrano una buona formazione di ECM.

Questi materiali, allo stato liquido, vengono inseriti negli ugelli e quindi posizionati in modo selettivo utilizzando un sistema di controllo computerizzato



Sviluppi

Il tessuto cartilagineo nativo presenta limitazioni per quanto riguarda la riparazione spontanea perché manca del potenziale di proliferazione nei condrociti e vi è poca migrazione di cellule rigenerative



Allo stesso modo, il tessuto cartilagineo rigenerato nel corpo affronterà lo stesso ambiente avverso della cartilagine nativa.

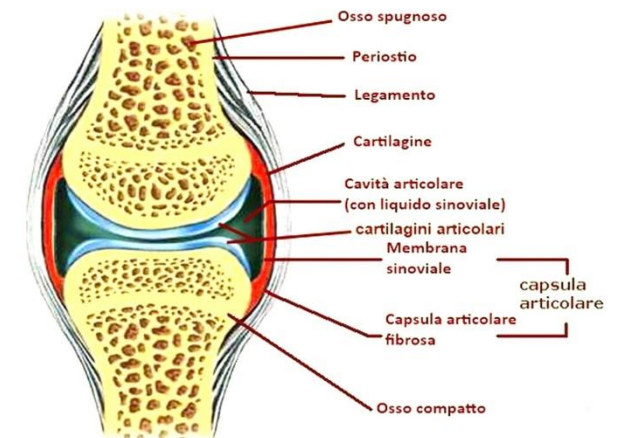
Il successo clinico a lungo termine della riparazione della cartilagine rimane una sfida importante, nonostante molti risultati positivi ottenuti con modelli animali.

La ricerca futura nel campo del bioprinting di tessuti cartilaginei dovrebbe quindi includere la creazione di nuove strategie, attraverso la combinazione di metodi attuali risultati efficaci con una migliore comprensione dei problemi clinici che portano al fallimento



Bioprinting del tessuto osteocondrale

- Il tessuto osteocondrale è composto da cartilagine articolare e sottostante osso subcondrale; è un tessuto eterogeneo complesso.
- Nell'attuale ricerca clinica, l'approccio più comune è quello di impiantare autologhi innesti osteocondrali ottenuti da un donatore in un difetto per ripristinare la cartilagine e ossea.
- La tecnologia di stampa 3D presenta vantaggi, in particolare nella fabbricazione e ricostruzione del tessuto osteocondrale progettato, perché è un tessuto complesso ed eterogeneo.



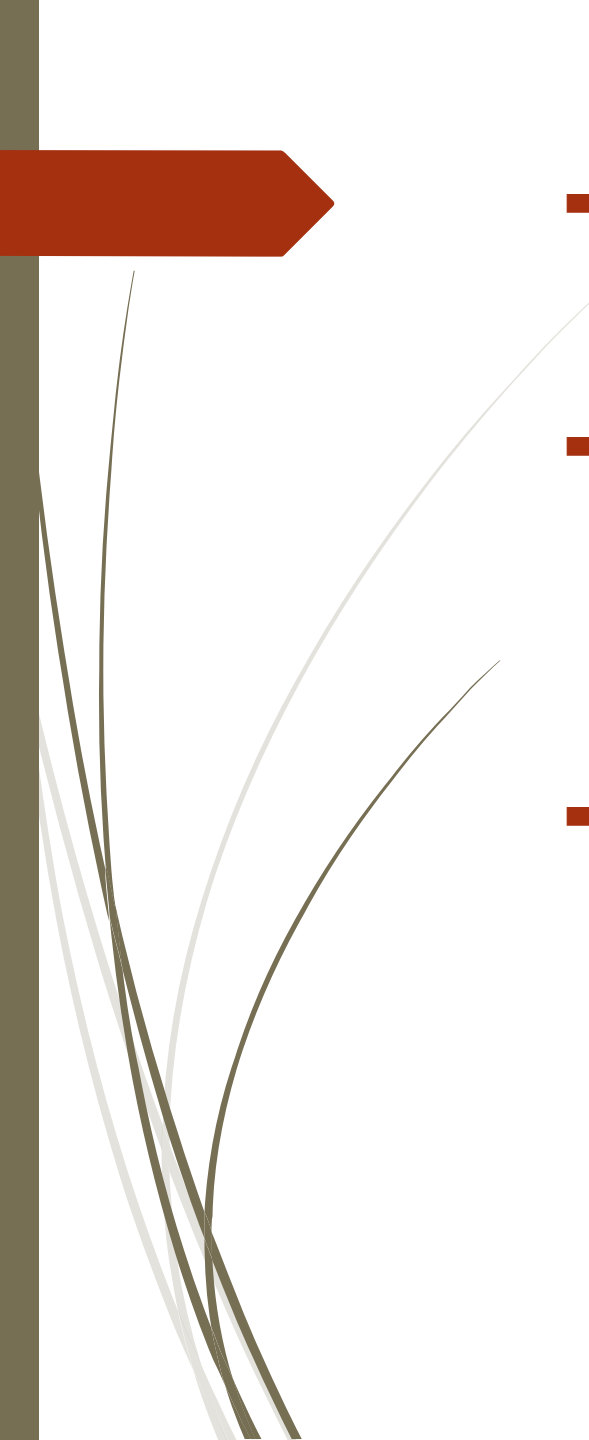


Requisiti essenziali

- *Biocompatibilità* → Il tessuto osteocondrale contiene cartilagine articolare e ossa. La cartilagine articolare è cartilagine ialina (contenente condrociti), abbondante collagene di tipo 2 e proteoglicani. L'osso, invece, contiene osteoblasti, abbondante collagene di tipo 1 e composti idrossiapatite, con calcio e fosfato.
- *Proprietà meccaniche* → sopportare le forze di carico in vivo. L'impalcatura osteocondrale dovrebbe resistere alla forza esterna data dal movimento (camminata) e mantenere la sua forma 3D; mentre i condrociti e gli osteoblasti formano cartilagine e ossa. Inoltre, la parte inferiore dell'osso di una struttura osteocondrale dovrebbe avere pori interconnessi per fornire nutrienti e ossigeno.

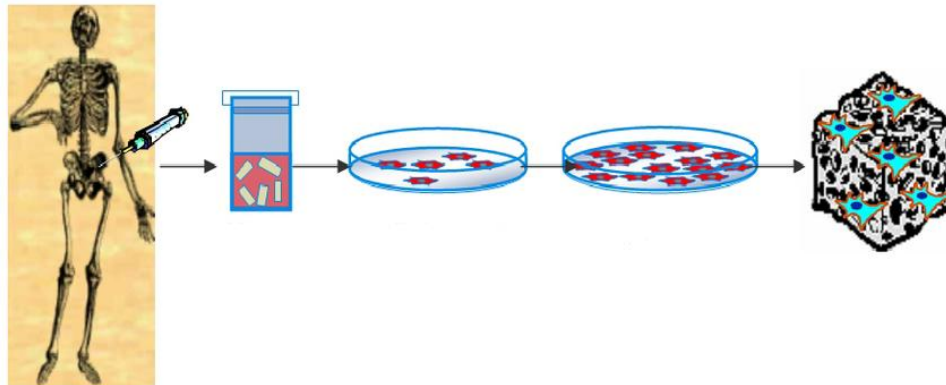
- *Scelta dei biomateriali da utilizzare con le cellule* → dovrebbe prendere in considerazione i periodi presi dai condrociti e dagli osteoblasti per differenziare e formare la cartilagine e ossa.
- *Biodegradabilità* → le celle stampate in idrogel o polimeri sintetici proliferano e si differenziano per formare il tessuto bersaglio nell'ambiente in vivo; sia nel naturale che nel sintetico i biomateriali dovrebbero degradarsi adeguatamente.

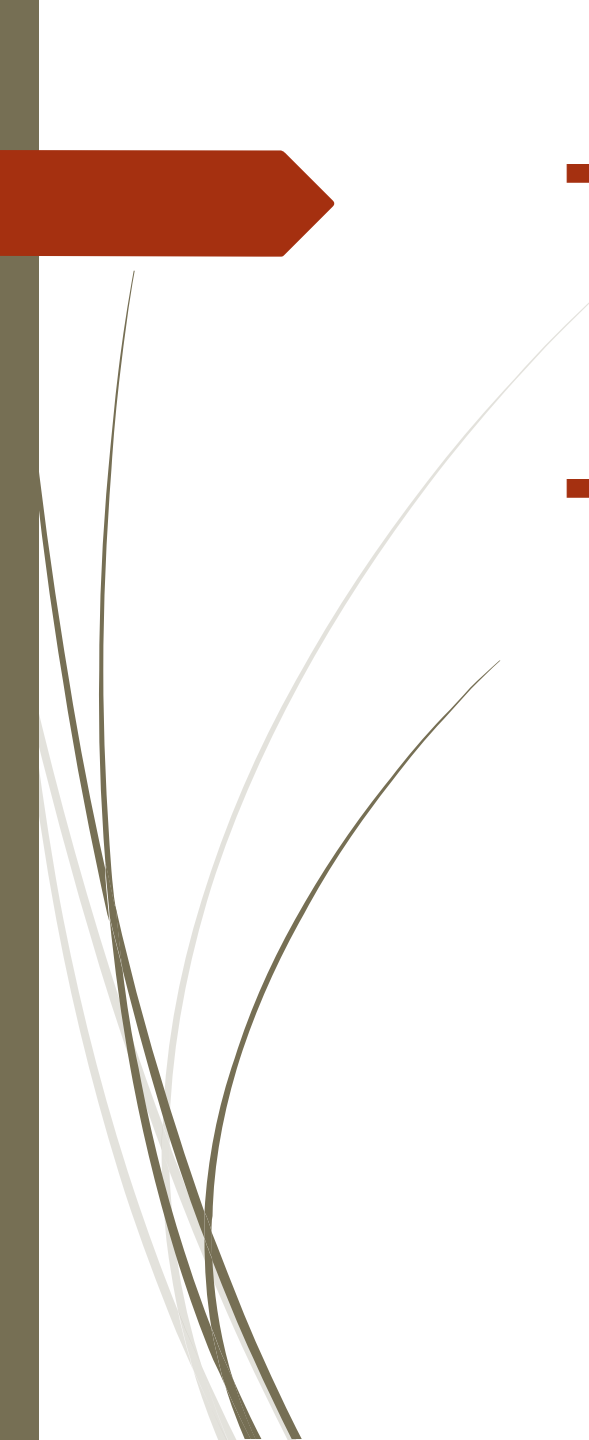


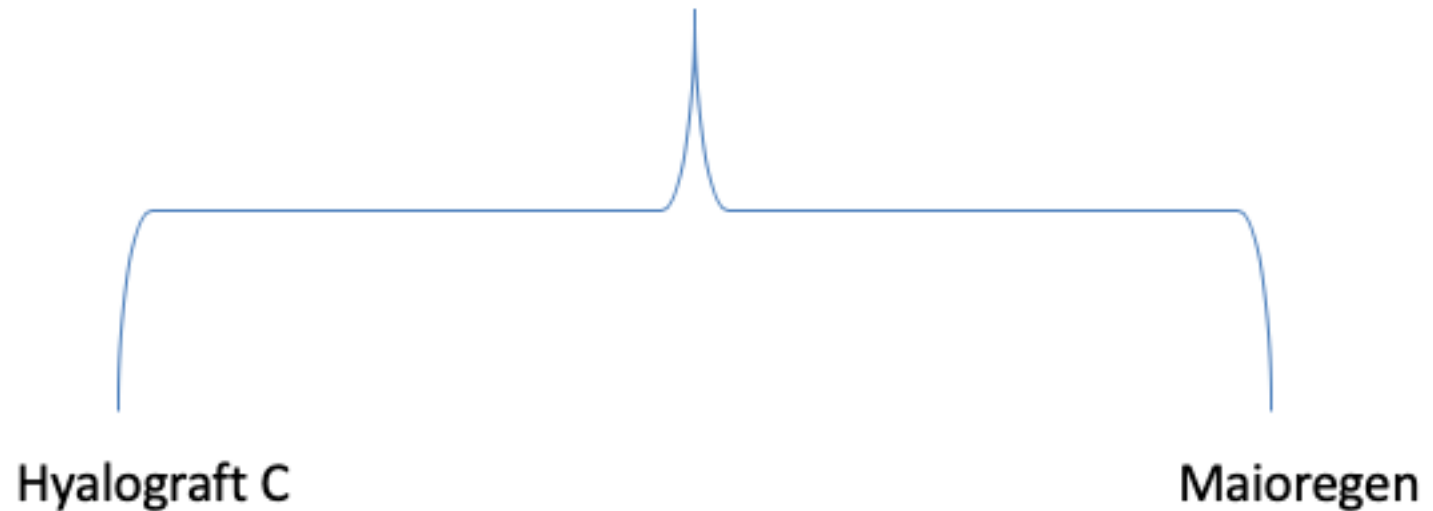
- 
- Osso e cartilagine sono, per la ricostruzione o la rigenerazione mediante trapianto autologo di cellule / tessuti, una delle tecnologie più promettenti.
 - Cellule usate osteoblasti, condrociti, cellule staminali mesenchimali da tessuto duro e recentemente quelle da tessuto adiposo (potenziale per differenziarsi) Sviluppo di strutture fabbricate e strutture stampate a cellule con bio-materiali per la stampa 3D
 - La stampa 3D ha il vantaggio che uno o più tipi di cellule o idrogel carichi di cellule possono essere stampati in modo accurato, con pori completamente interconnessi nello scaffold e con miglioramento geometrico e strutturale del modulo meccanico di compressione e forza.

Trattamento lesioni osteocondrali mediante scaffold

- Gli innesti 3-D bioingegnerizzati possono essere ottenuti coltivando le cellule del paziente su scaffold composti da biomateriali porosi, che rappresentano il substrato per lo sviluppo del tessuto.
- Gli impianti osteocondrali bioingegnerizzati permettono di evitare la morbosità del sito donatore e possono essere adattati facilmente alle dimensioni ed alla posizione del difetto.
- Gli sforzi della chirurgia in campo osteocondrale, sono rivolti all'elaborazione di tecniche che permettano di ripristinare un mantello cartilagineo articolare con caratteristiche biologiche e morfo-funzionali sempre più analoghe a quelle della cartilagine sana.



- 
- La bioingegneria tissutale apre nuove prospettive chirurgiche, attraverso l'utilizzo di biomateriali bioingegnerizzati che potenzialmente garantiscono all'innesto osteocondrale una maggiore adattabilità al sito della lesione e quindi una miglior congruenza generale del giunto articolare con notevoli vantaggi dal punto di vista strutturale, biologico e biomeccanico.
 - Due tipologie di interventi praticati con frequenza



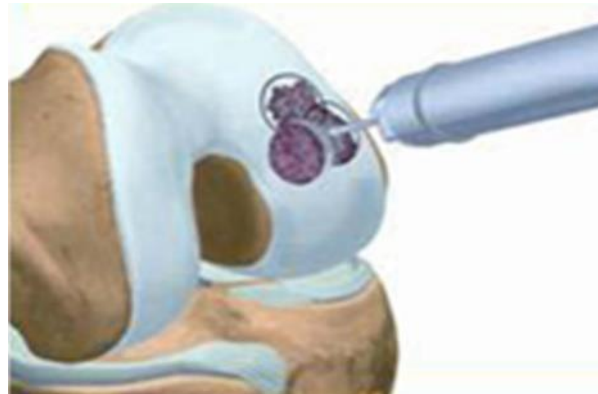
Hylograft C

- Scaffold bioingegnerizzato a base di acido ialuronico usato intorno al 2000.
- Questo prodotto bioingegnerizzato presenta numerosi vantaggi:
 - Biodegradabile
 - Biocompatibile
 - estrema maneggevolezza che ha consentito di sviluppare una tecnica di impianto di condrociti artroscopica.
- Il trapianto di condrociti autologhi necessita di un doppio tempo chirurgico, ma confrontato con le altre tecniche a disposizione, non presenta le complicanze legate al sito donatore, è di facile esecuzione e permette di ripristinare un tessuto cartilagineo valido e duraturo.



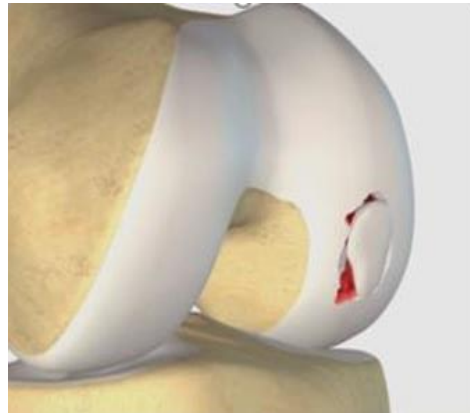
Processo per Hylograft C

- Mappatura del sito di lesione cartilaginea
- Preparazione del sito di lesione con fresa cannulata
- Creazione di un'area con margini ben definiti adatti a ricevere l'innestoImpianto dello scaffold Hyalograft C con adesione all'osso subcondrale della zona da trattare
- I risultati a lungo termine confermano una stabilità dei buoni risultati nella maggioranza dei casi.

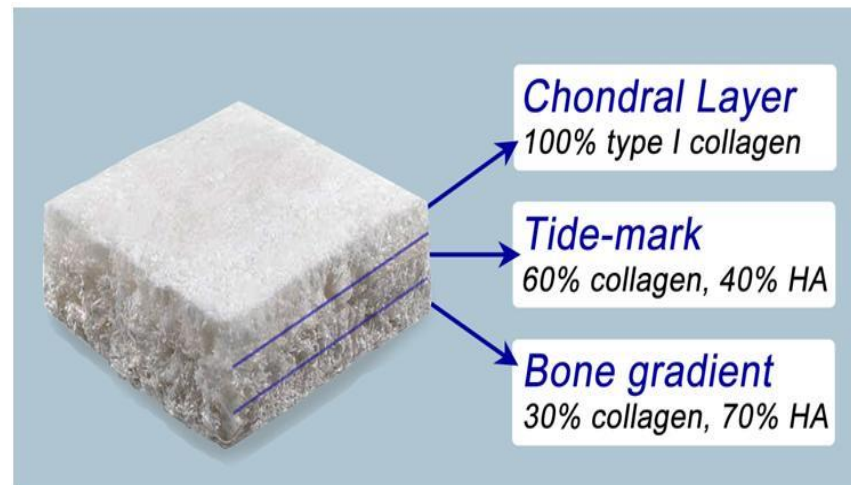


Maioregen

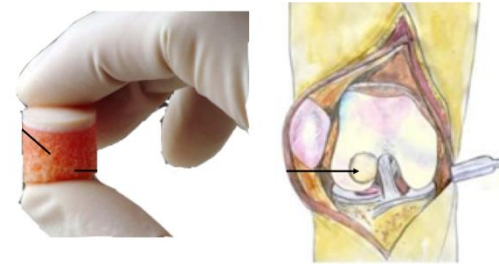
- Scaffold a 3 gradienti per trattamento delle lesioni osteocondrali
- La logica con cui questo scaffold è stato progettato si basa essenzialmente su alcuni principi consolidati nell'ambito della rigenerazione dei tessuti del sistema scheletrico, in particolare del comparto anatomico osteocartilagineo.
- La conformazione dello scaffold è in grado di promuovere la neoformazione di tessuto cartilagineo e di tessuto osseo sub-condrale in maniera guidata nel rispetto della struttura biochimica, morfologica e geometrica del comparto anatomico osteocartilagineo, pertanto può essere definito come scaffold con proprietà biomimetiche.



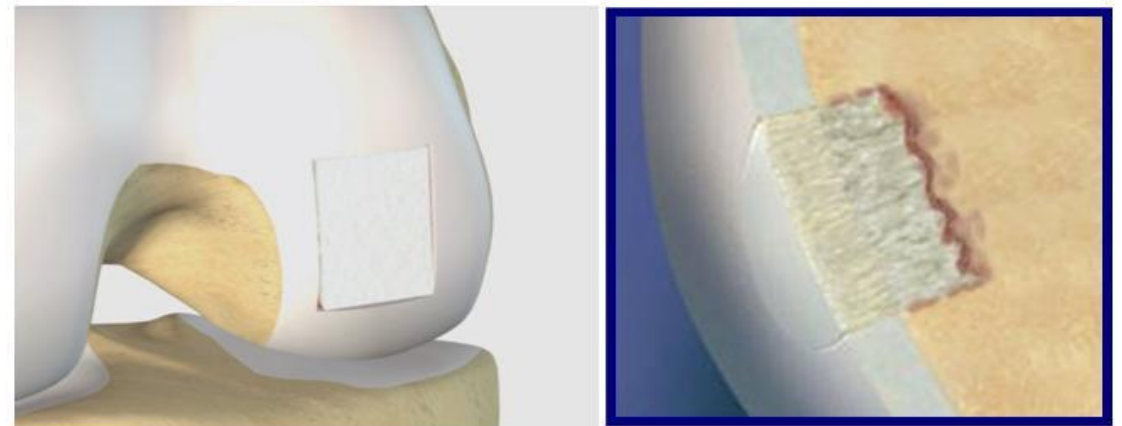
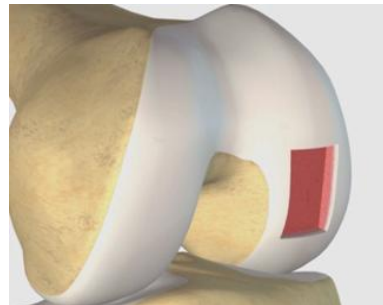
- Lo scaffold è costituito da tre strati di idrossiapatite e di collagene di tipo I in percentuali differenti a seconda della profondità dello strato e quindi delle caratteristiche tissutali.
- Strato 1 (superficiale) di collagene di tipo I, per rigenerare la superficie cartilaginea;
- Strato 2 di transizione;
- Strato 3 (profondo) di collagene di tipo I/idrossiapatite in rapporto 30%-70%, per rigenerare l'osso subcondrale



- Il dispositivo si presenta come una struttura flessibile che ne consente elevata maneggevolezza ed adattabilità al difetto da trattare.



- La lesione osteocondrale viene preparata per accogliere lo scaffold. Una volta innestato, lo scaffold ricopre tutta l'area lesionata e stimola la proliferazione cellulare da parte dei tessuti circostanti al fine di restituire continuità anatomica della zona trattata.



- Successivamente, in 4 anni la valutazione ha evidenziato un miglioramento statisticamente significativo in tutti gli scores utilizzati e nel ritorno alla pratica sportiva, tornando al livello di attività precedente l'inizio dei sintomi.



- Inoltre, è stata osservata un'ottima integrazione dello scaffold con i tessuti circostanti, con buona qualità dei tessuti neoformati. I risultati ottenuti sono promettenti anche per il trattamento delle lesioni osteocondrali più complesse.
- E' stato testato questo nuovo biomateriale prima in studi preclinici ottenendo buoni risultati nella rigenerazione della cartilagine e del tessuto osseo. Il biomateriale ha indotto infatti una rigenerazione in situ attraverso le cellule staminali provenienti dal midollo osseo.