

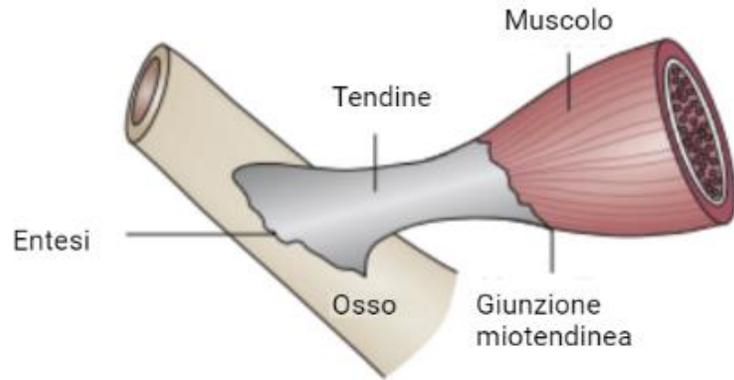
# Formulazione e caratterizzazione di un bioink a base di alginato e fibroina per il bioprinting del tendine

**Candidato:** Benedetta Frongia

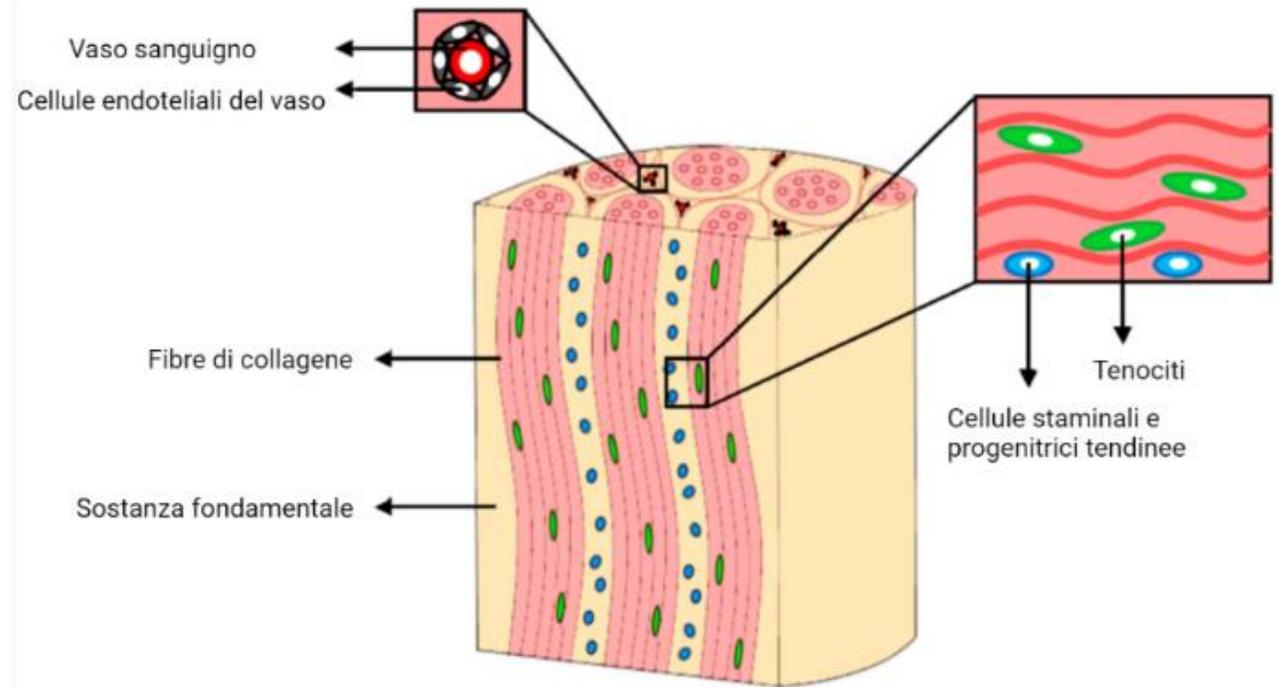
**Relatore:** Prof. Michele Conti  
**Correlatori:** Giulia Maria Di Gravina,  
Franca Scozza

**A.A. 2021/2022**

A)



B)



- Funzione: trasmettere all'osso la forza creata nel muscolo
- Anisotropia e viscoelasticità
- Modulo di Young da 20 a 1200 MPa

# Stato dell'arte: trattamento lesione tendinea



Normale



Rotto

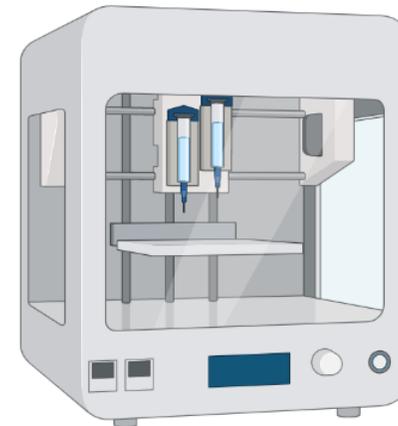
Colpisce circa 31  
persone ogni  
100000 all'anno

## Approcci tradizionali:

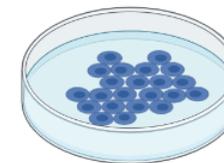
- Conservativo
- Chirurgico



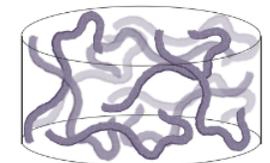
## Ingegneria dei tessuti



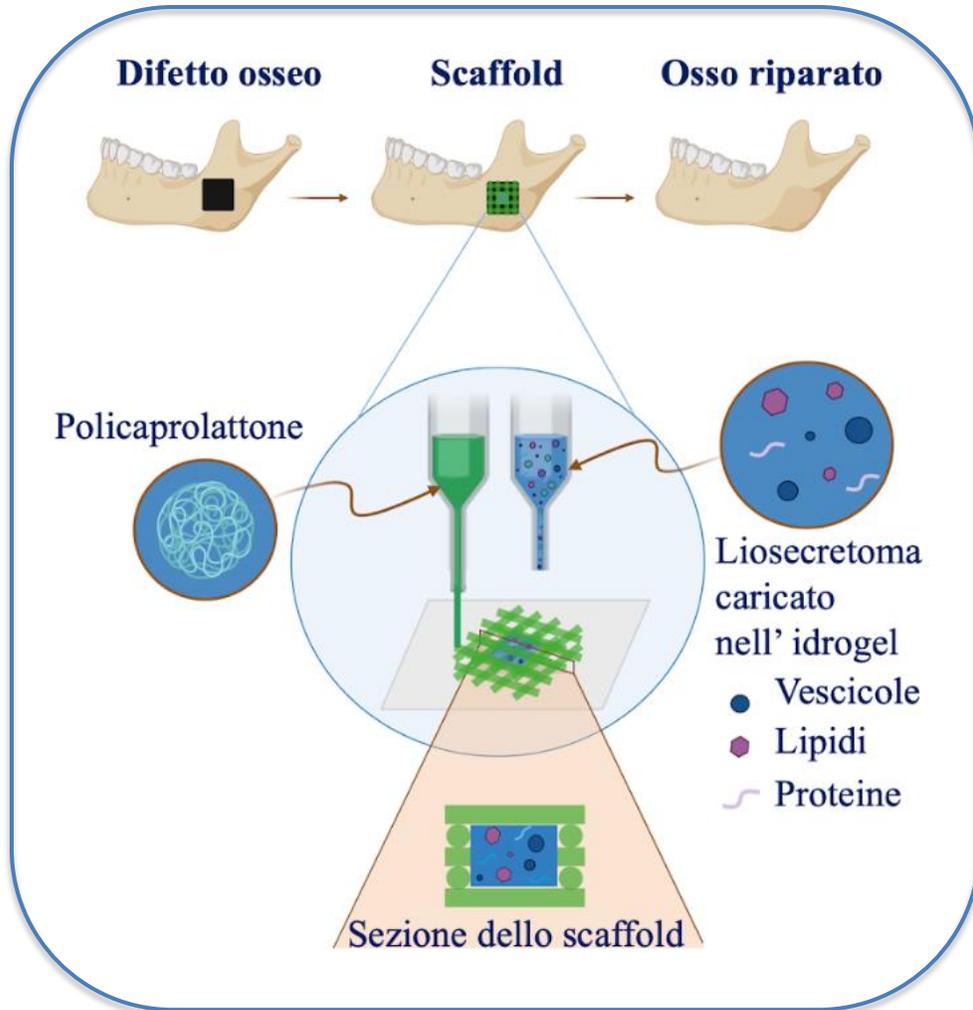
cellule



biomateriale



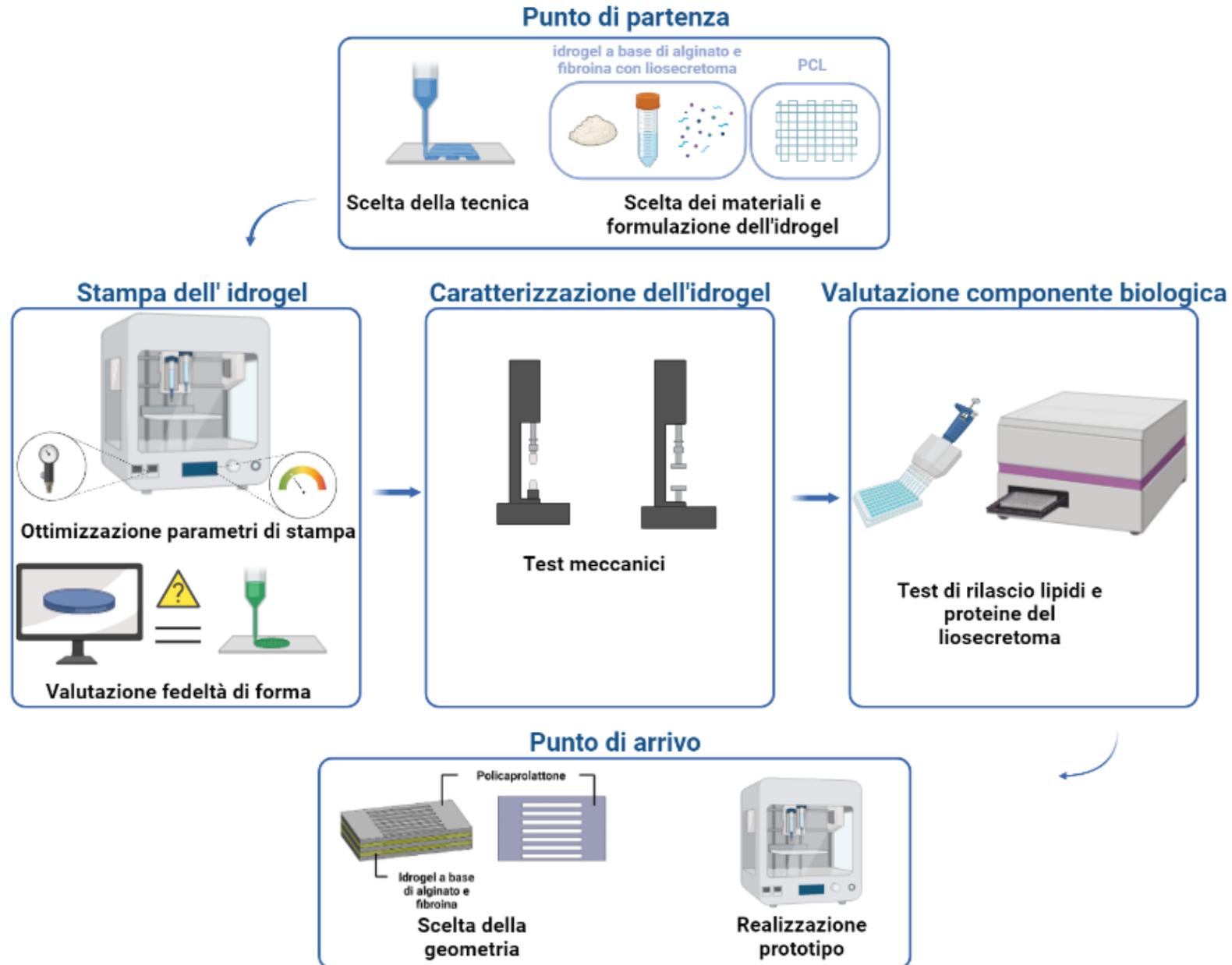
## Studio di partenza

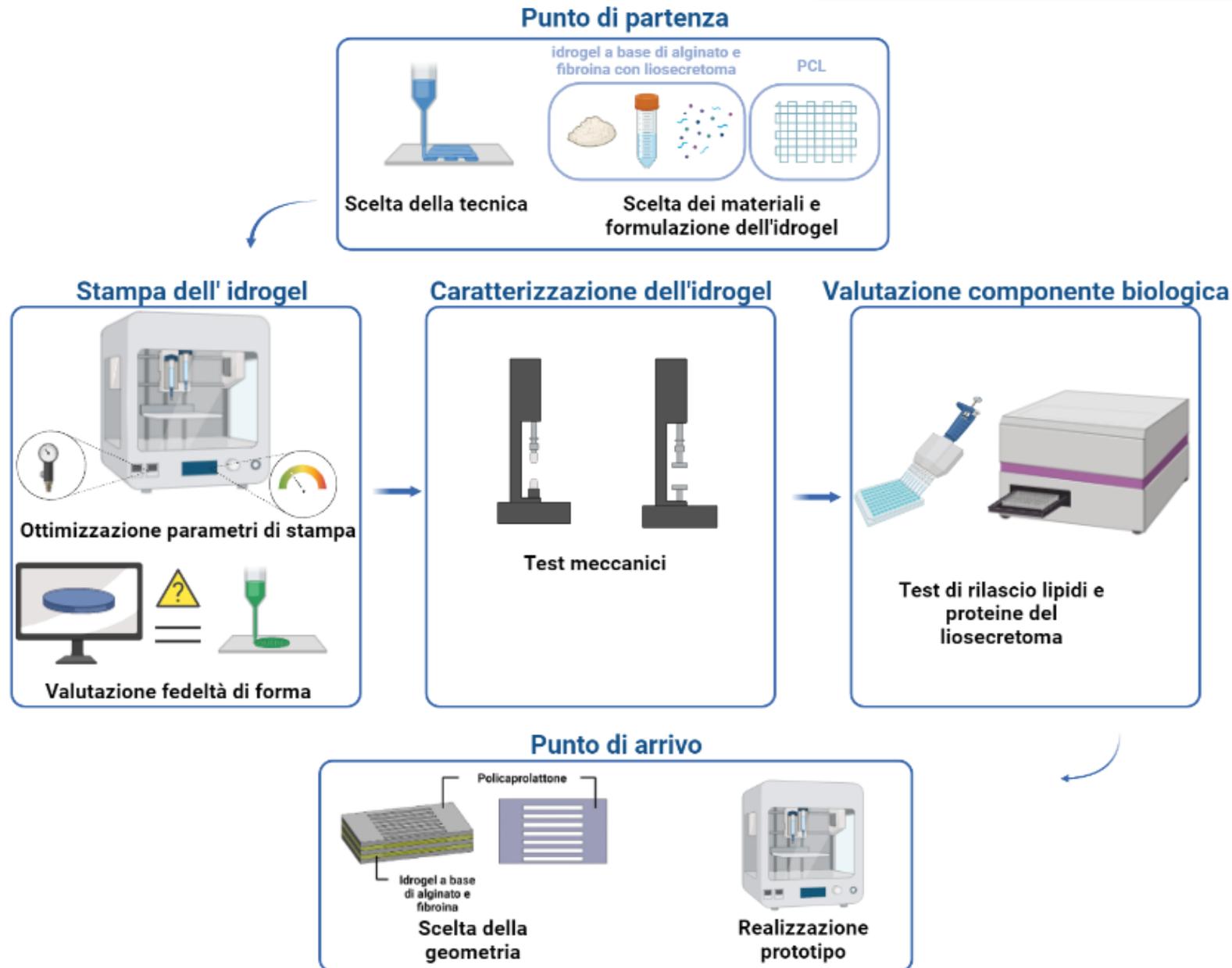


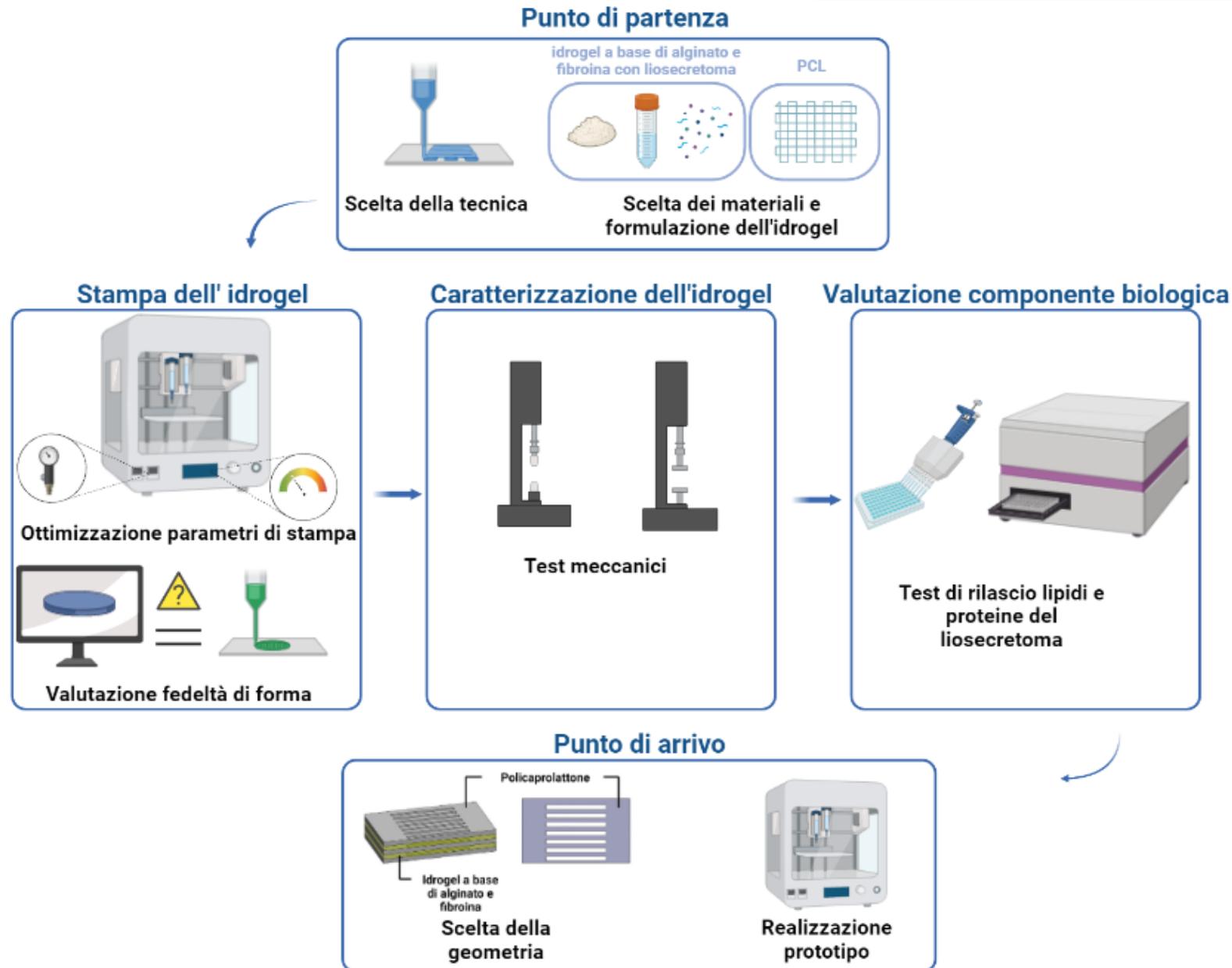
## Lavoro di tesi

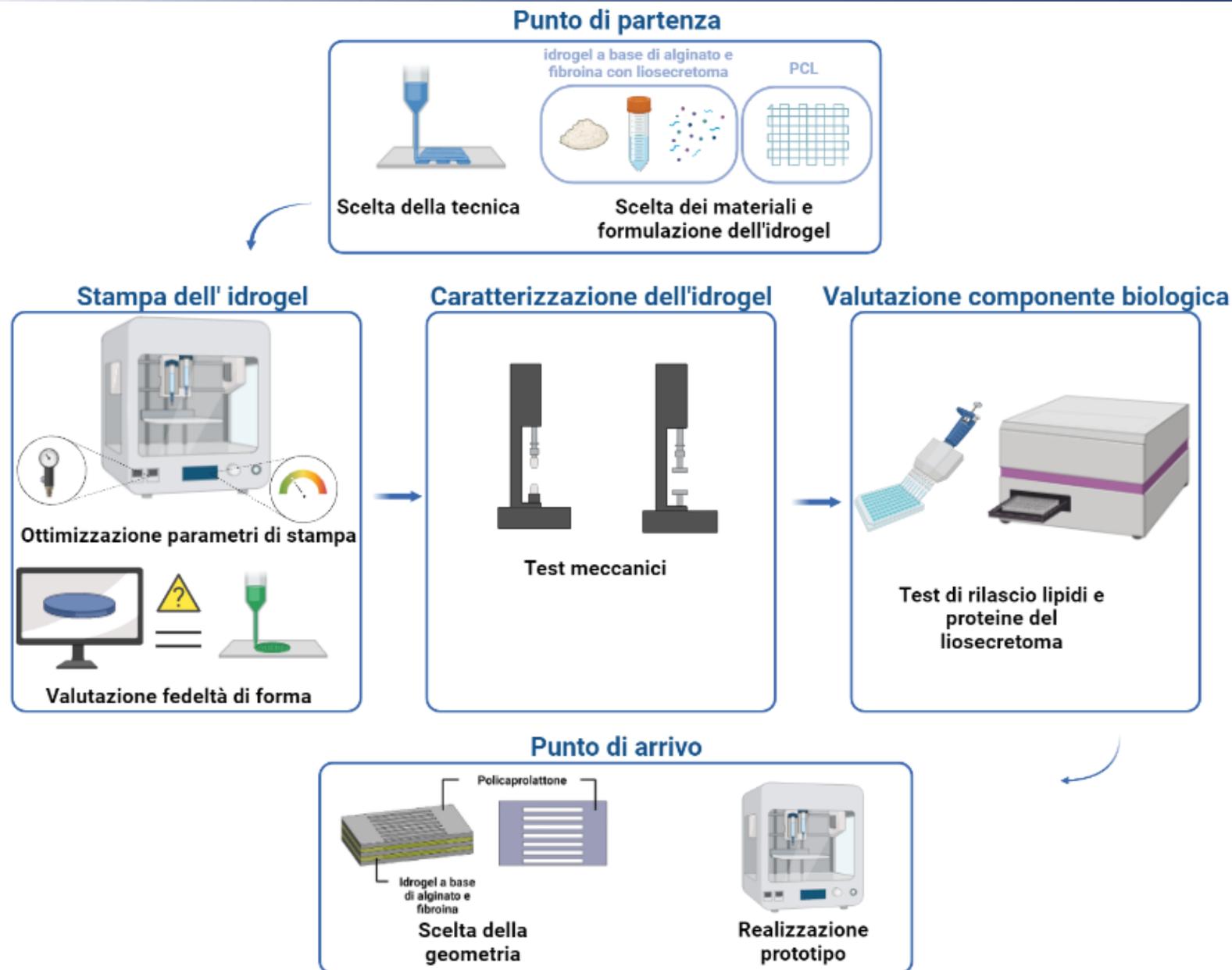


Bari, E.; Scocozza, F.; Perteghella, S.; Sorlini, M.; Auricchio, F.; Torre, M.L.; Conti, M. 3D Bioprinted Scaffolds Containing Mesenchymal Stem/Stromal Lyosecretome: Next Generation Controlled Release Device for Bone Regenerative Medicine. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 515.

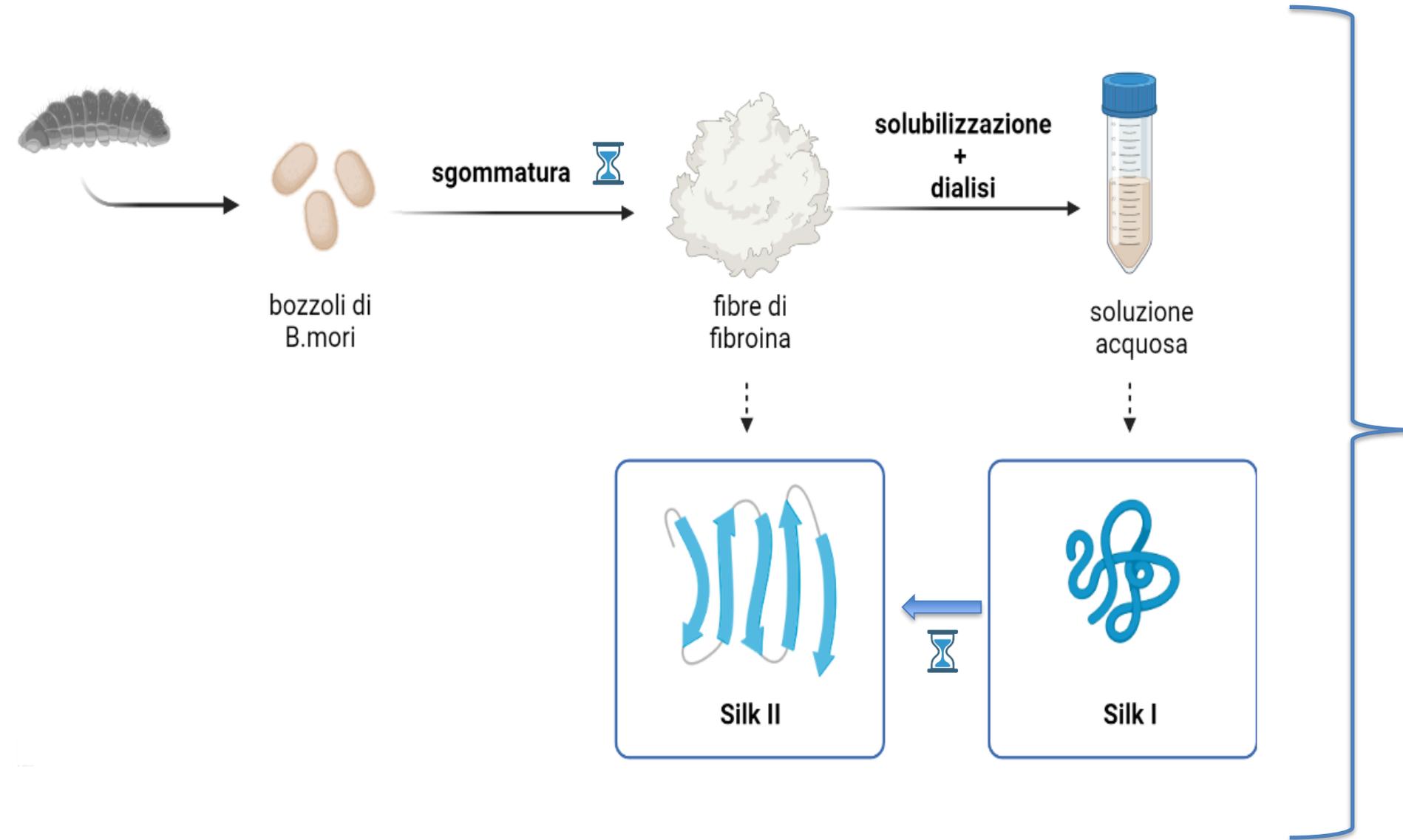






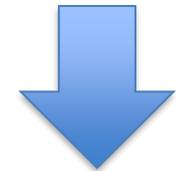


# Fibroina della seta: protocollo di preparazione

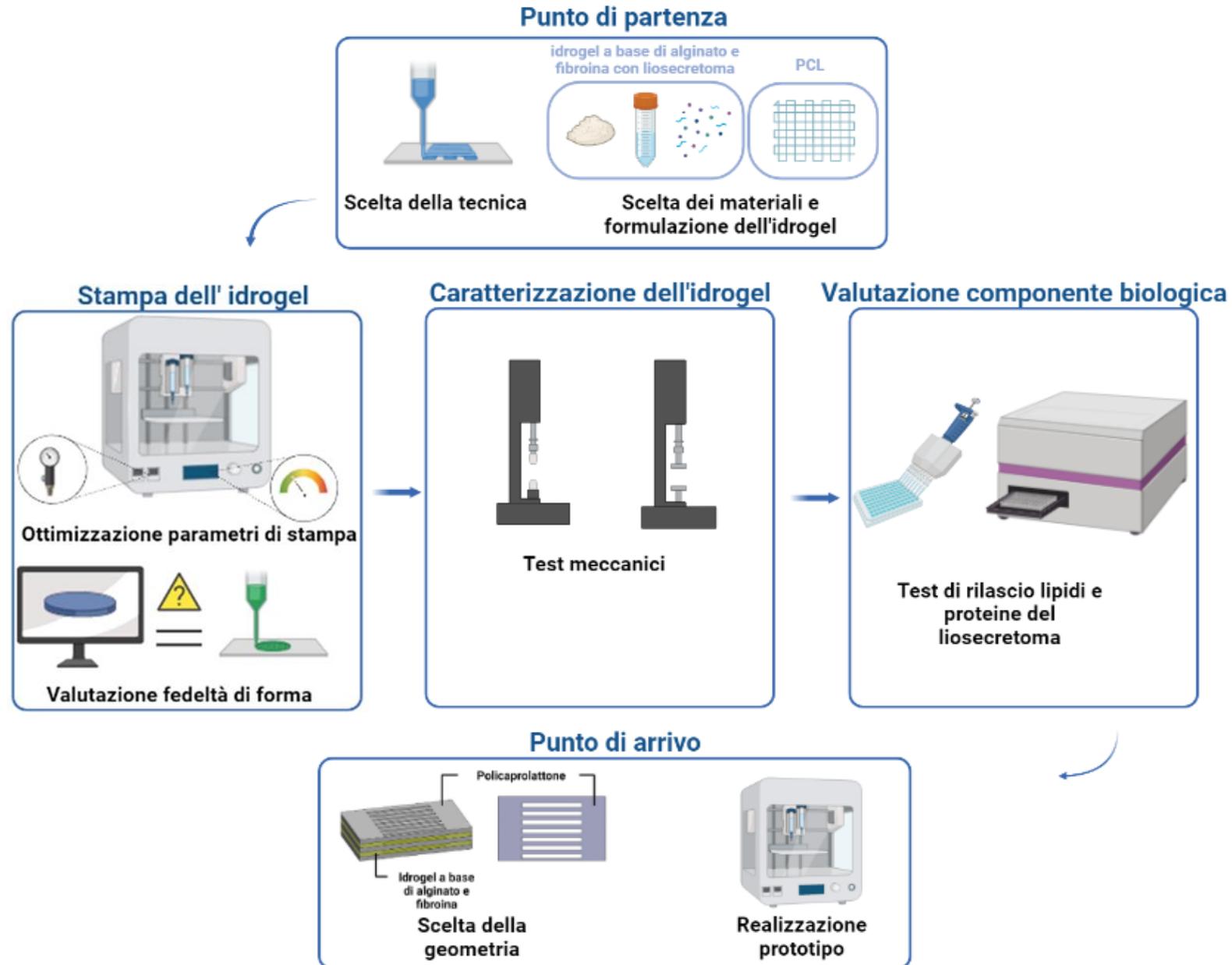


Comportamento  
dipendente da:

- Durata del processo di sgommatura
- Tempo dalla preparazione della soluzione acquosa

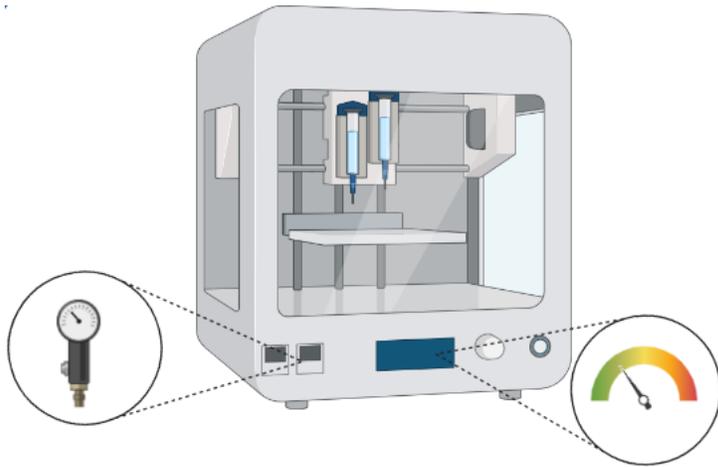


- **3 lotti con differente sgommatura: 1, 2 e 4 ore**
- **2 time point: 7 e 14 giorni**



## Ottimizzazione dei parametri di stampa:

- Pressione
- Velocità

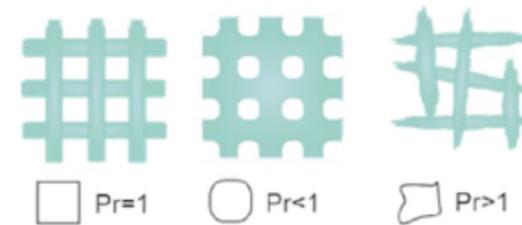
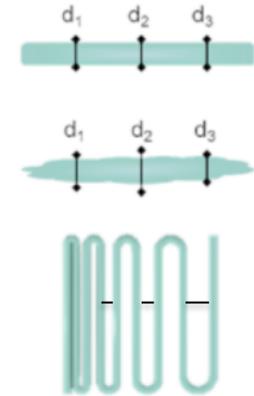


Protocollo proposto da **Paxton et al.\***: stampa di una serpentina variando la velocità. Fissata la velocità ottimale, variando la pressione

\*Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. Biofabrication. 2017

## Valutazione della fedeltà di forma attraverso:

- Diametro del filamento
- Distanza tra i filamenti
- Indice di stampabilità



$$Pr = \frac{\pi}{4C} = \frac{L^2}{16A}$$

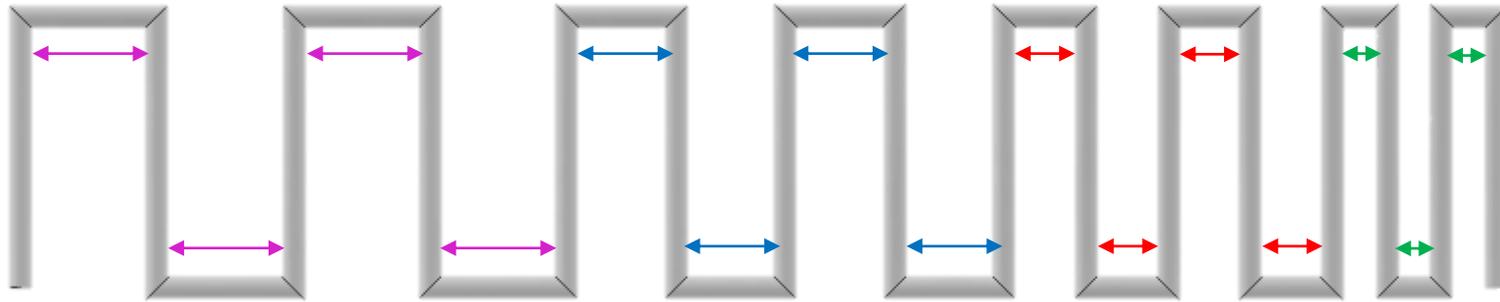
$$C = \frac{4A}{L^2} \pi$$

Protocollo proposto da **Schwab et al.\***

\*Schwab A, Levato R, D'Este M, Piluso S, Eglin D, Malda J. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. Chem Rev. 2020 Oct 14;120(19)

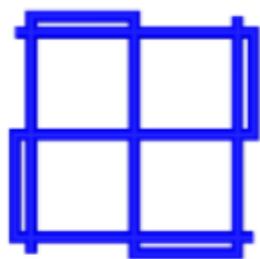
# Valutazione delle prestazioni di stampa: geometrie utilizzate

Stampa 1

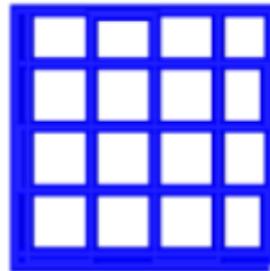


- **Ottimizzazione parametri di stampa**
- **Valutazione fedeltà di forma:**
  - Diametro del filamento
  - Distanza tra i filamenti

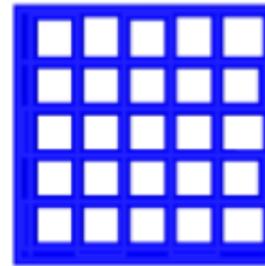
Stampa 2



Infill 10%



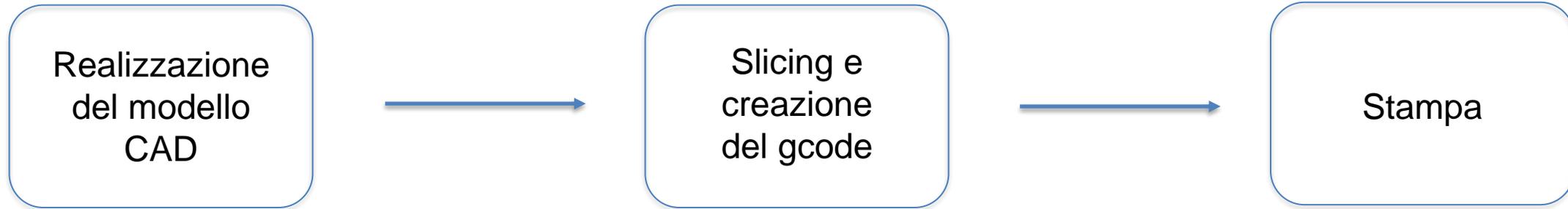
Infill 15%



Infill 20%



- **Valutazione fedeltà di forma:**
  - Indice di stampabilità



# Ottimizzazione parametri di stampa

**Metodo proposto da Paxton et al.\*:** stampa di una serpentina variando la velocità. Fissata la velocità ottimale, si fa variare la pressione

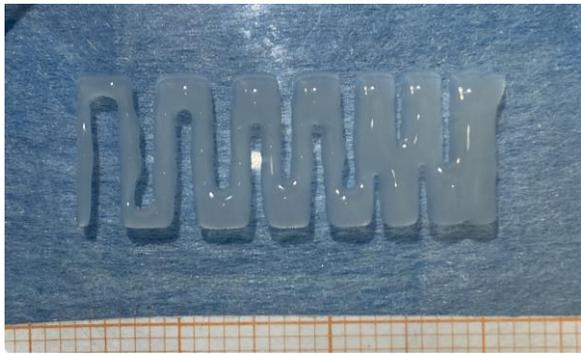
**Esempio:**



1000 mm/min ✓



600 mm/min



800 mm/min



400 mm/min



12 kPa



8 kPa ✓

\*Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. Biofabrication. 2017

# Ottimizzazione parametri di stampa: risultati

T1 (7 giorni)

T2 (14 giorni)

**ALG10-SF 1h**

1000 mm/min  
8 kPa  
12 kPa



**ALG10-SF 2h**

600 mm/min  
20 kPa  
30 kPa

600 mm/min  
20 kPa  
30 kPa

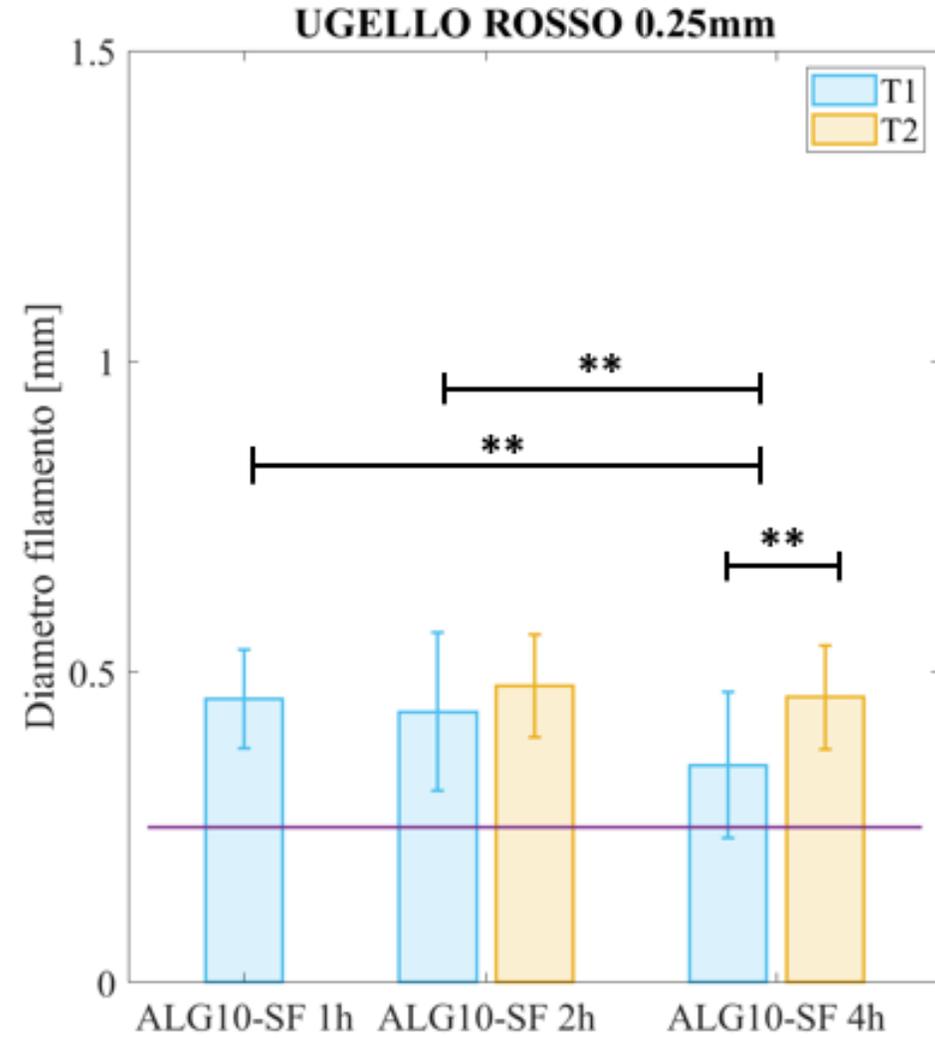
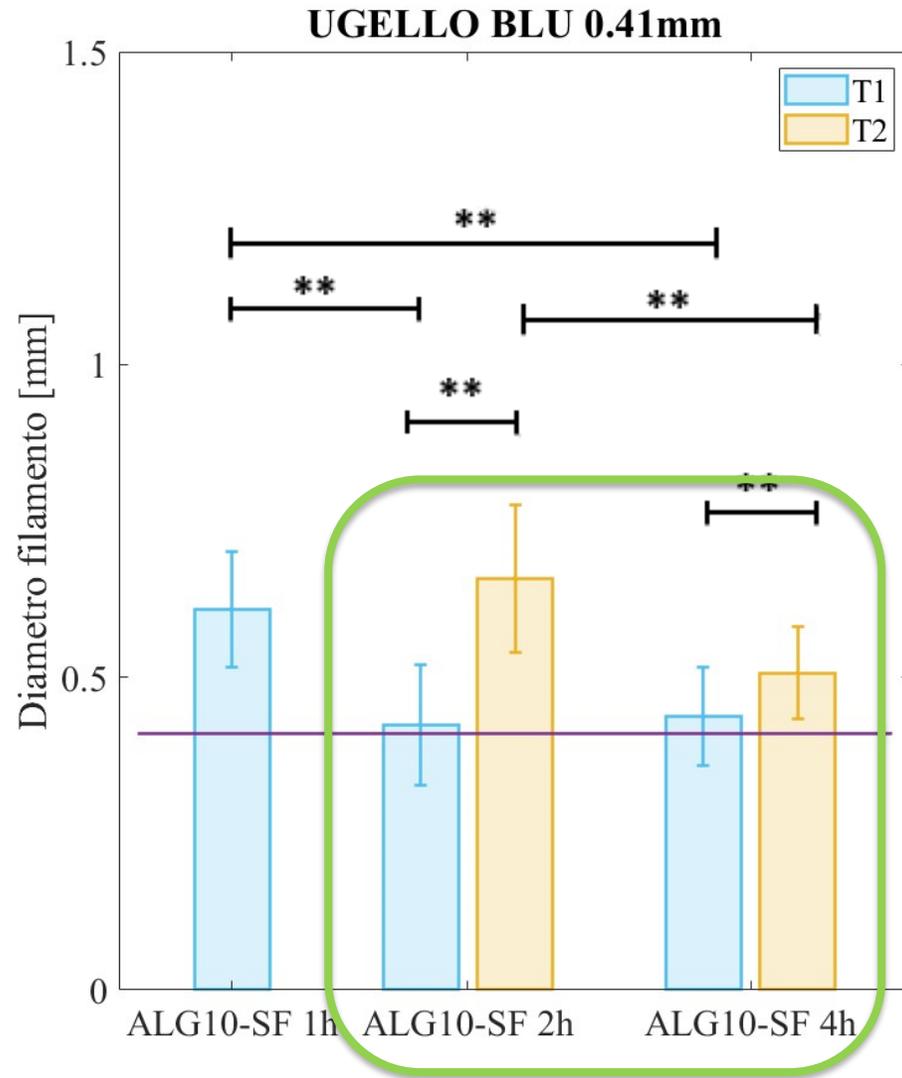
**ALG10-SF 4h**

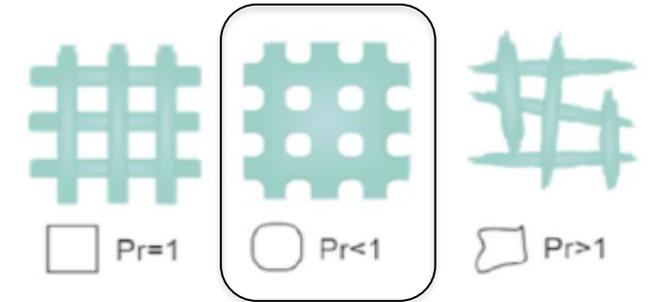
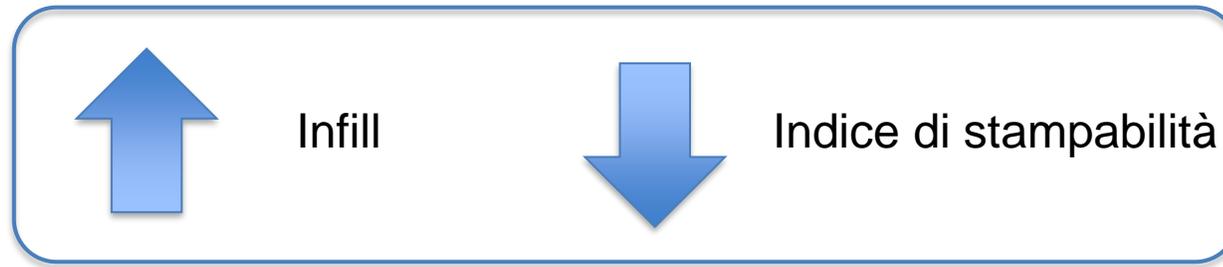
600 mm/min  
20 kPa  
35 kPa

600 mm/min  
20 kPa  
35 kPa

# Valutazione fedeltà di forma: risultati

\*\* =  $p$ -value < 0.01

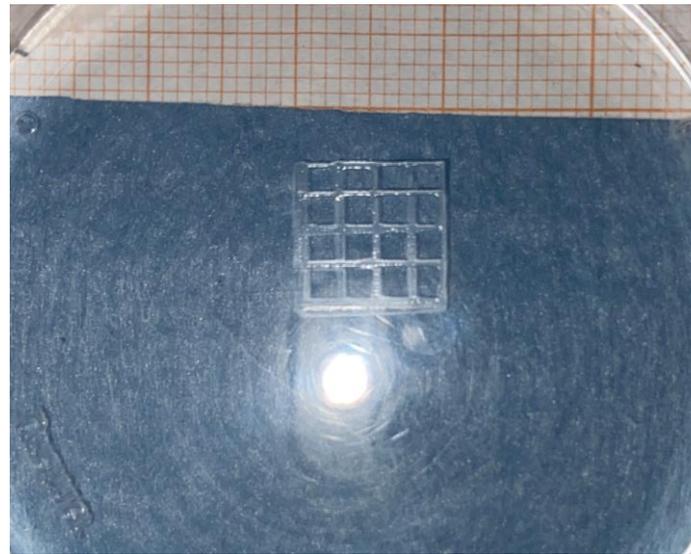




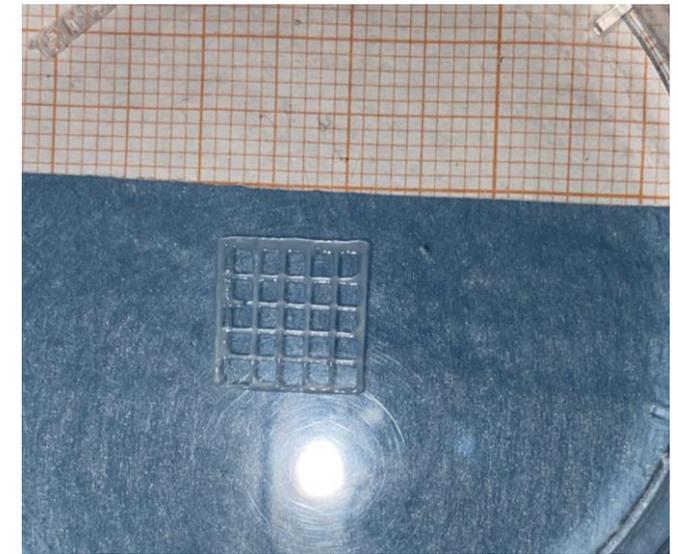
**Esempio:**



Infill 10%

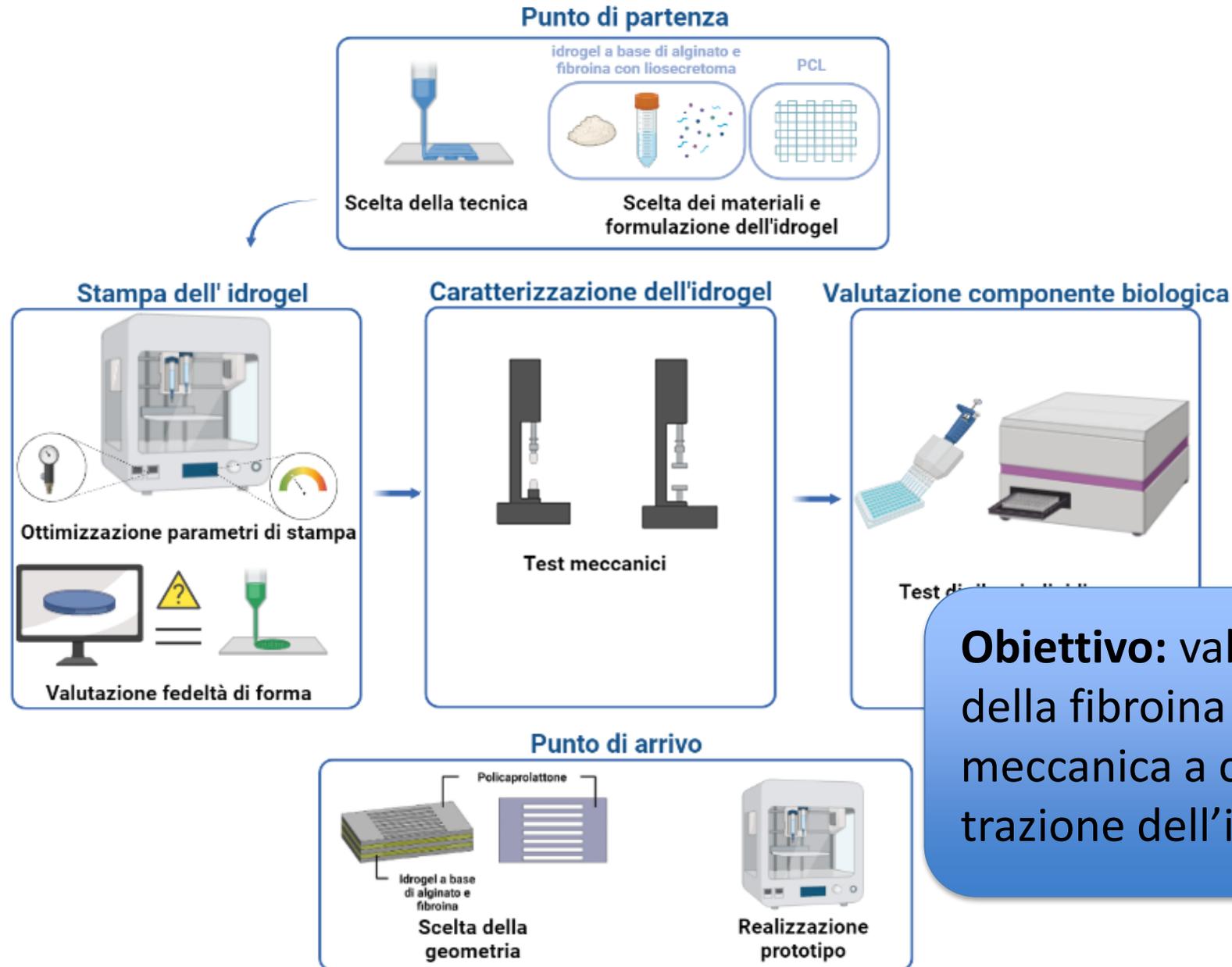


Infill 15%



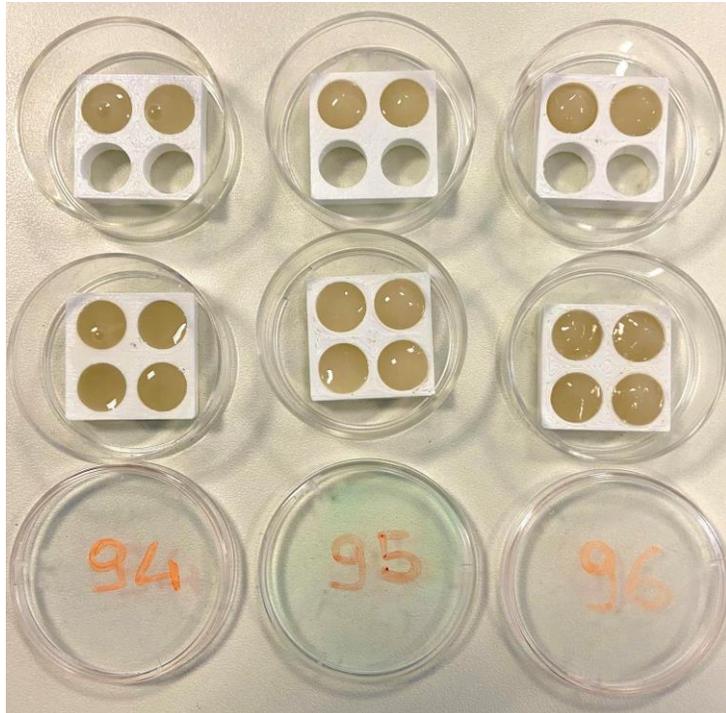
Infill 20%

$$1 > Pr_{\text{infill}10\%} > Pr_{\text{infill}15\%} > Pr_{\text{infill}20\%}$$



**Obiettivo:** valutare l'influenza della fibroina nella risposta meccanica a compressione e a trazione dell'idrogel

# Caratterizzazione meccanica: test a compressione

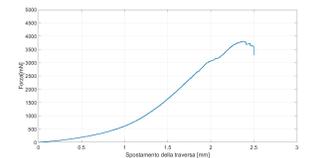
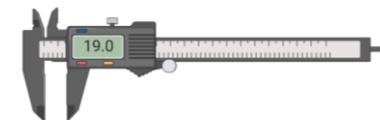


Preparazione dei campioni



Configurazione della macchina prima di iniziare la prova

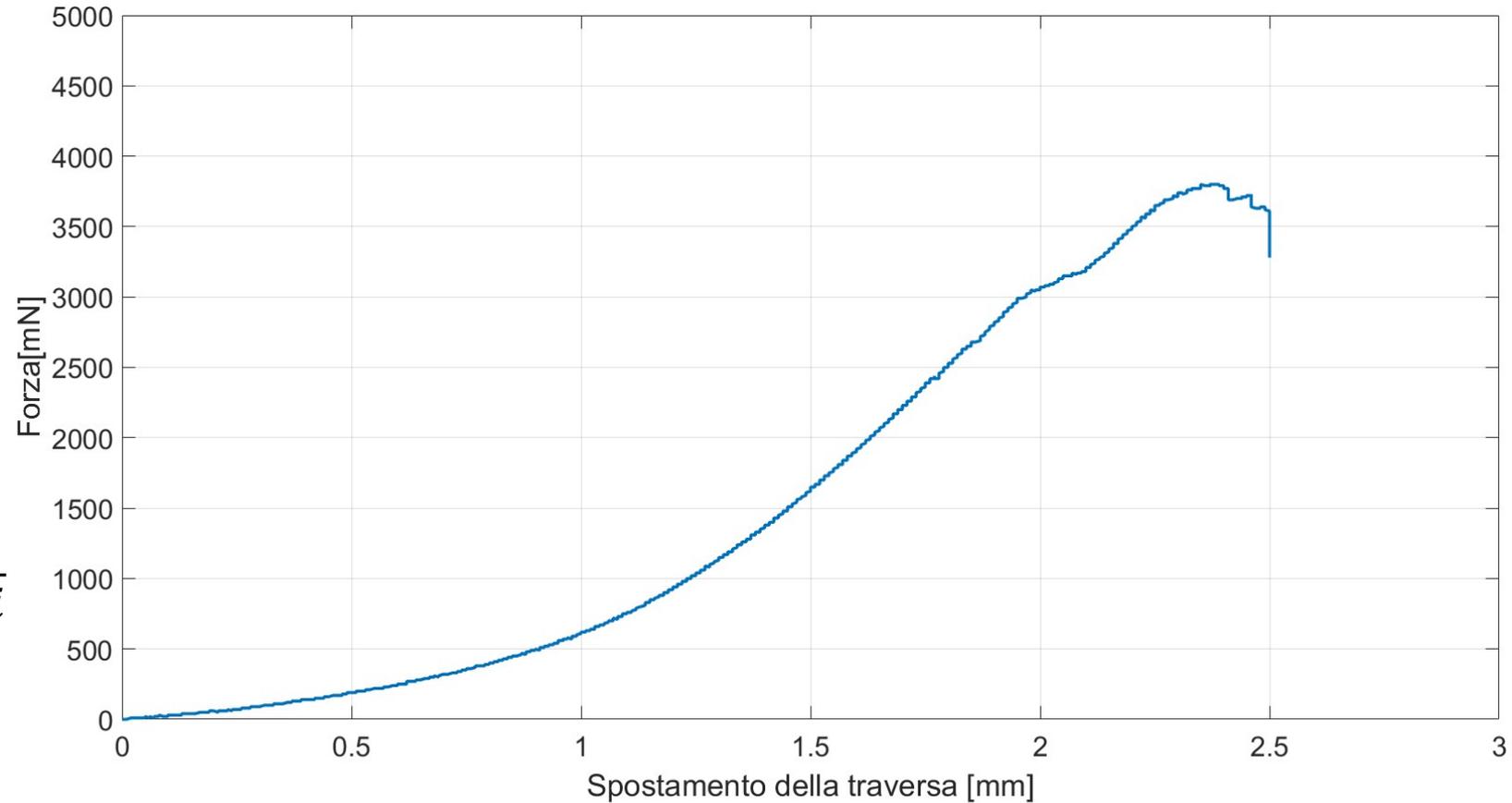
- Campioni cilindrici con diametro 8 mm
- Test ripetuti a **diversi time point**
- Gruppi di campioni:
  - idrogel con fibroina sgommato 1 h
  - idrogel con fibroina sgommato 2 h
  - idrogel con fibroina sgommato 4 h
- Gruppo di controllo:
  - idrogel di solo alginato



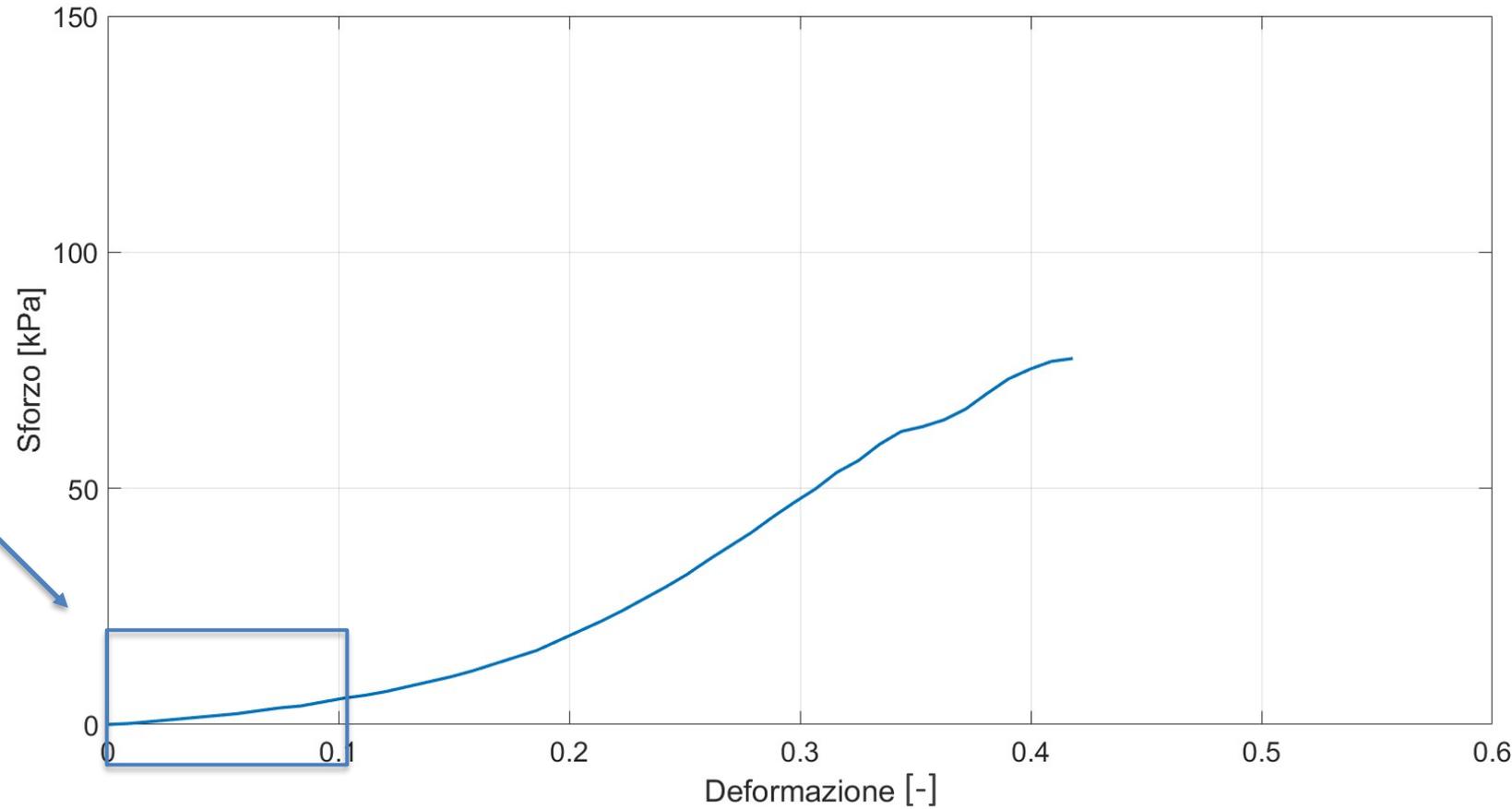
# Caratterizzazione meccanica: elaborazione delle curve

$$Sforzo = \frac{Forza}{Area}$$

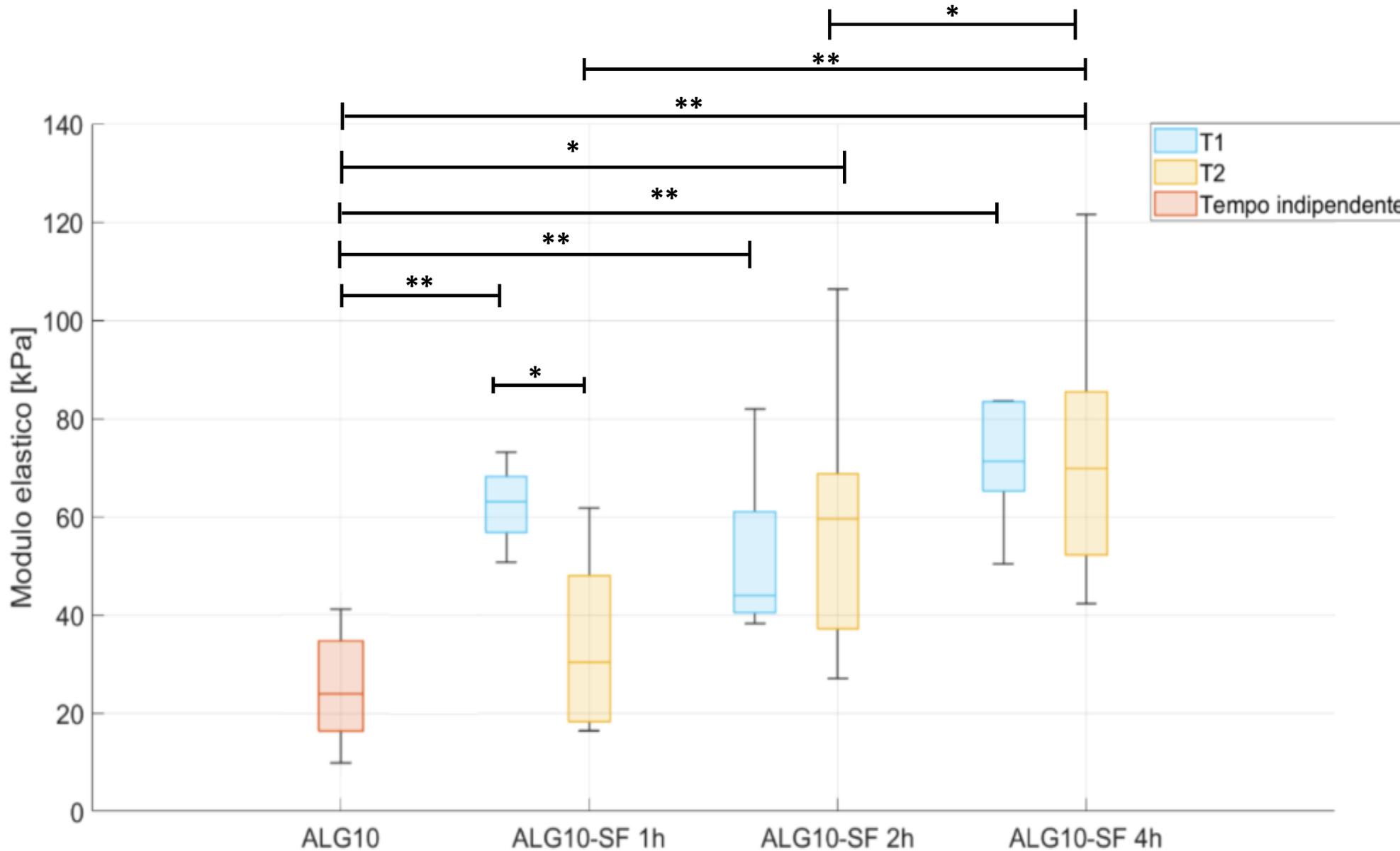
$$Deformazione = \frac{Spostamento\ traversa}{Separazione\ tra\ i\ piatti}$$



**Modulo a compressione**  
ricavato come pendenza della  
curva sforzo-deformazione



# Test a compressione: risultati



\* =  $p$ -value < 0.05

\*\* =  $p$ -value < 0.01

N. campioni = 8

La fibroina agisce sulla risposta a compressione dell'idrogel aumentandone il modulo a compressione

# Caratterizzazione meccanica: test a trazione

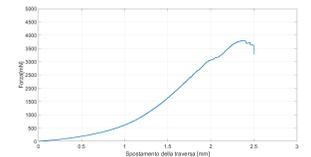


Stampo dove viene colato l'idrogel per realizzare i campioni



Configurazione della macchina prima di iniziare la prova

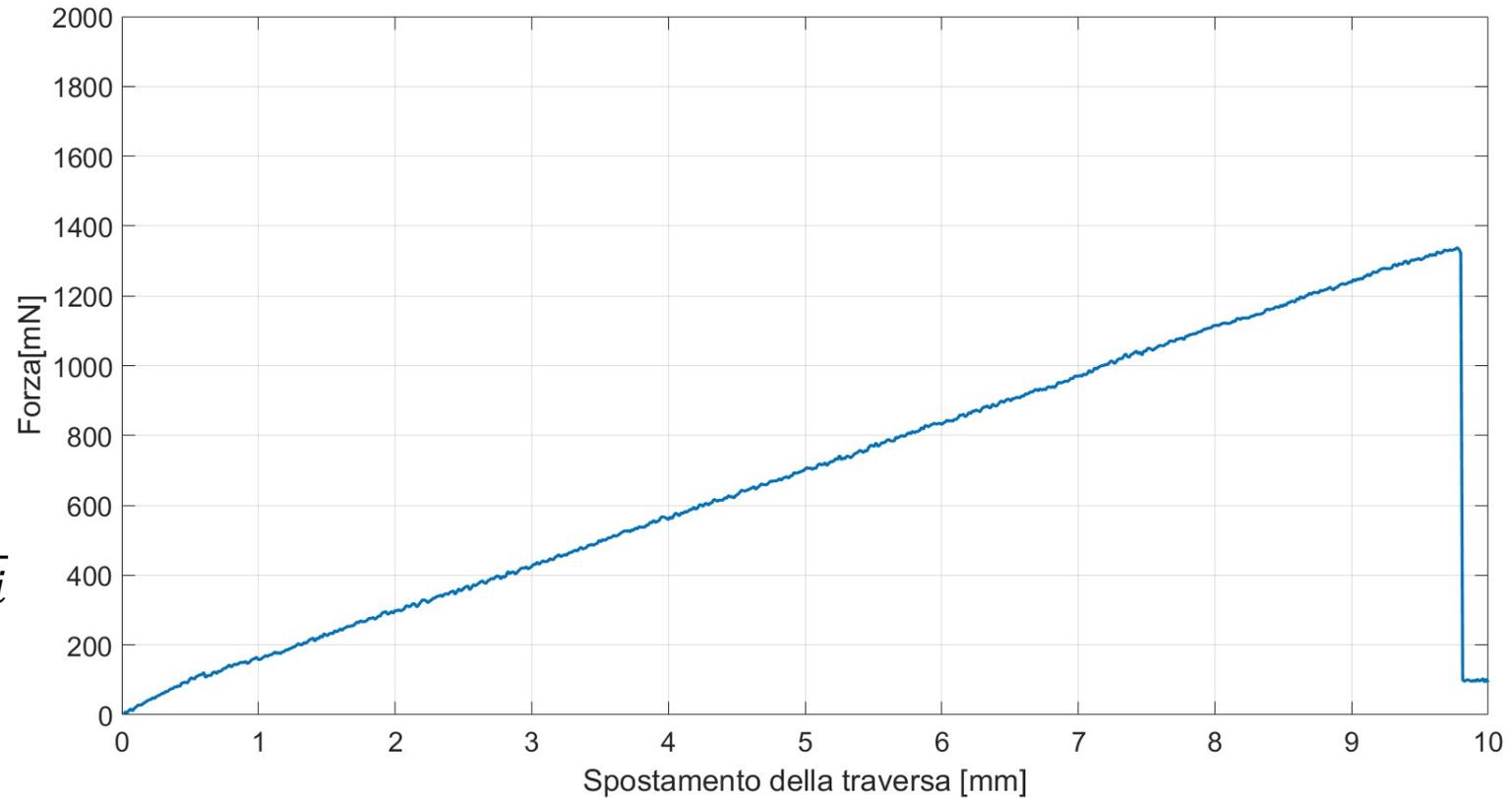
- Campioni ad osso di cane (standard ASTM F29000)
- Test ripetuti a **diversi time point**
- Gruppi di campioni:
  - idrogel con fibroina sgommato 1 h
  - idrogel con fibroina sgommato 2 h
  - idrogel con fibroina sgommato 4 h
- Gruppo di controllo:
  - idrogel di solo alginato



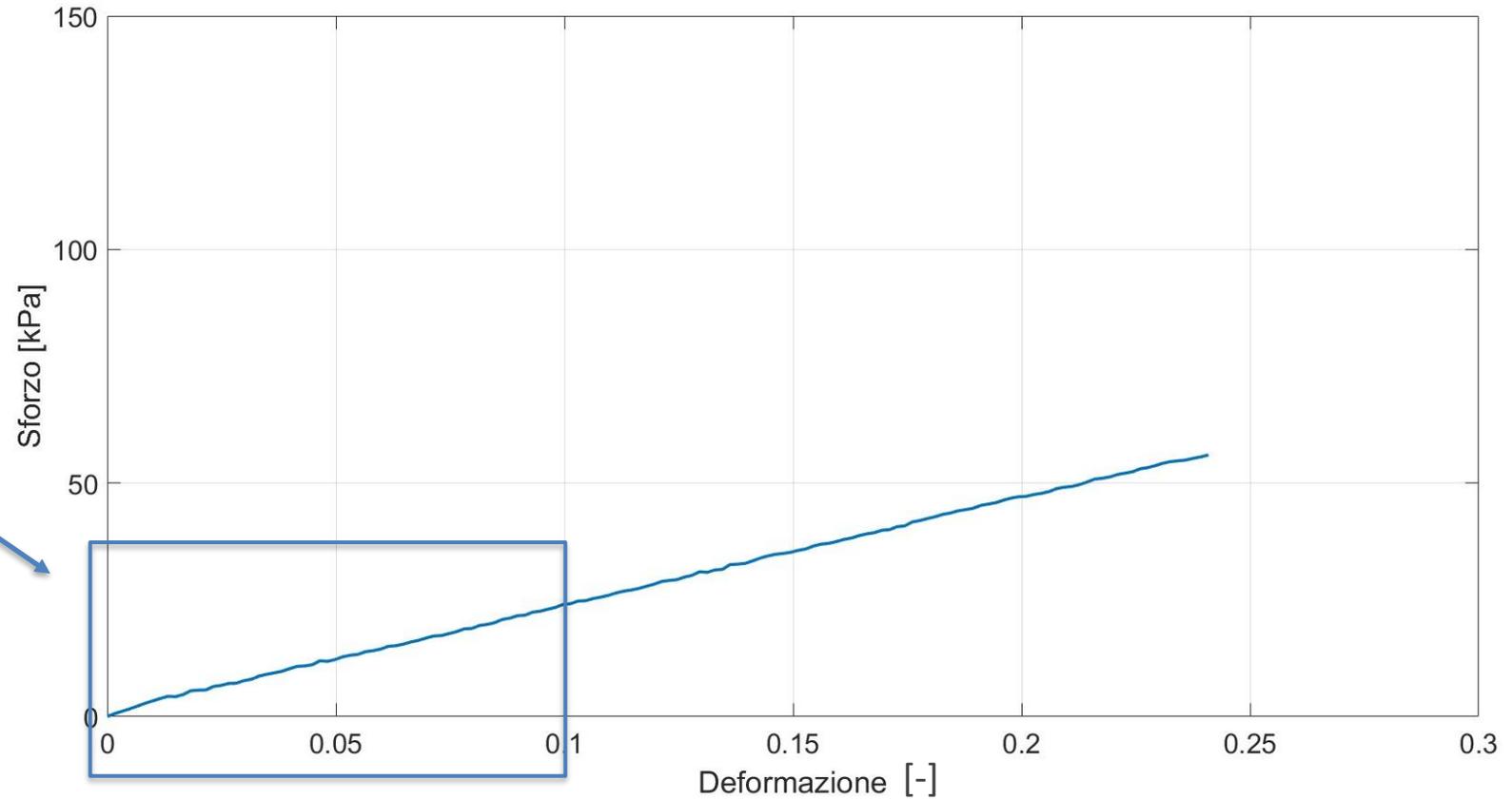
# Caratterizzazione meccanica: elaborazione delle curve

$$Sforzo = \frac{Forza}{Area}$$

$$Deformazione = \frac{Spostamento\ traversa}{Separazione\ tra\ afferraggi}$$

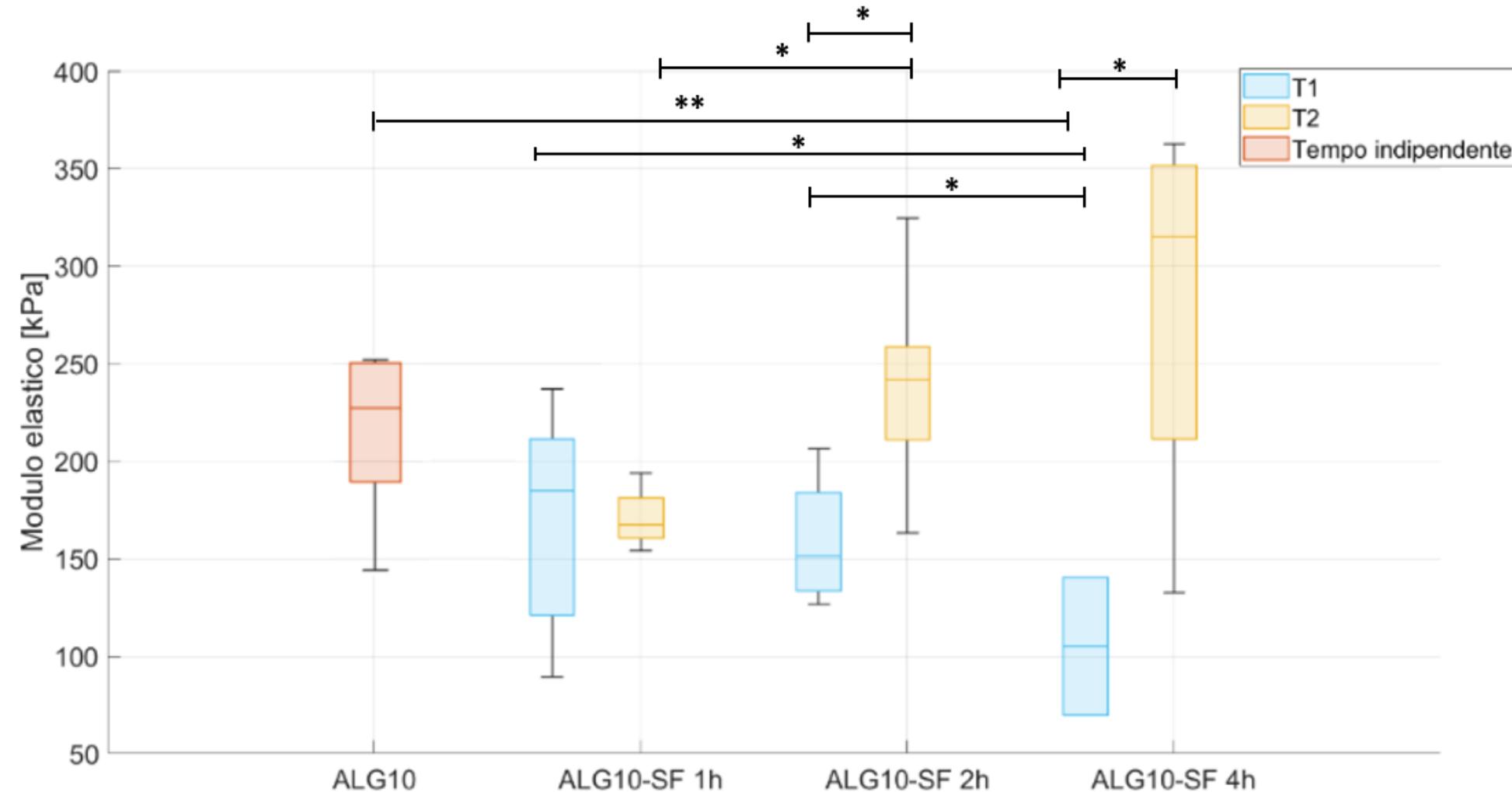


**Modulo a trazione** ricavato  
come pendenza della curva  
sforzo-deformazione



# Test a trazione: risultati

\* =  $p$ -value < 0.05  
\*\* =  $p$ -value < 0.01

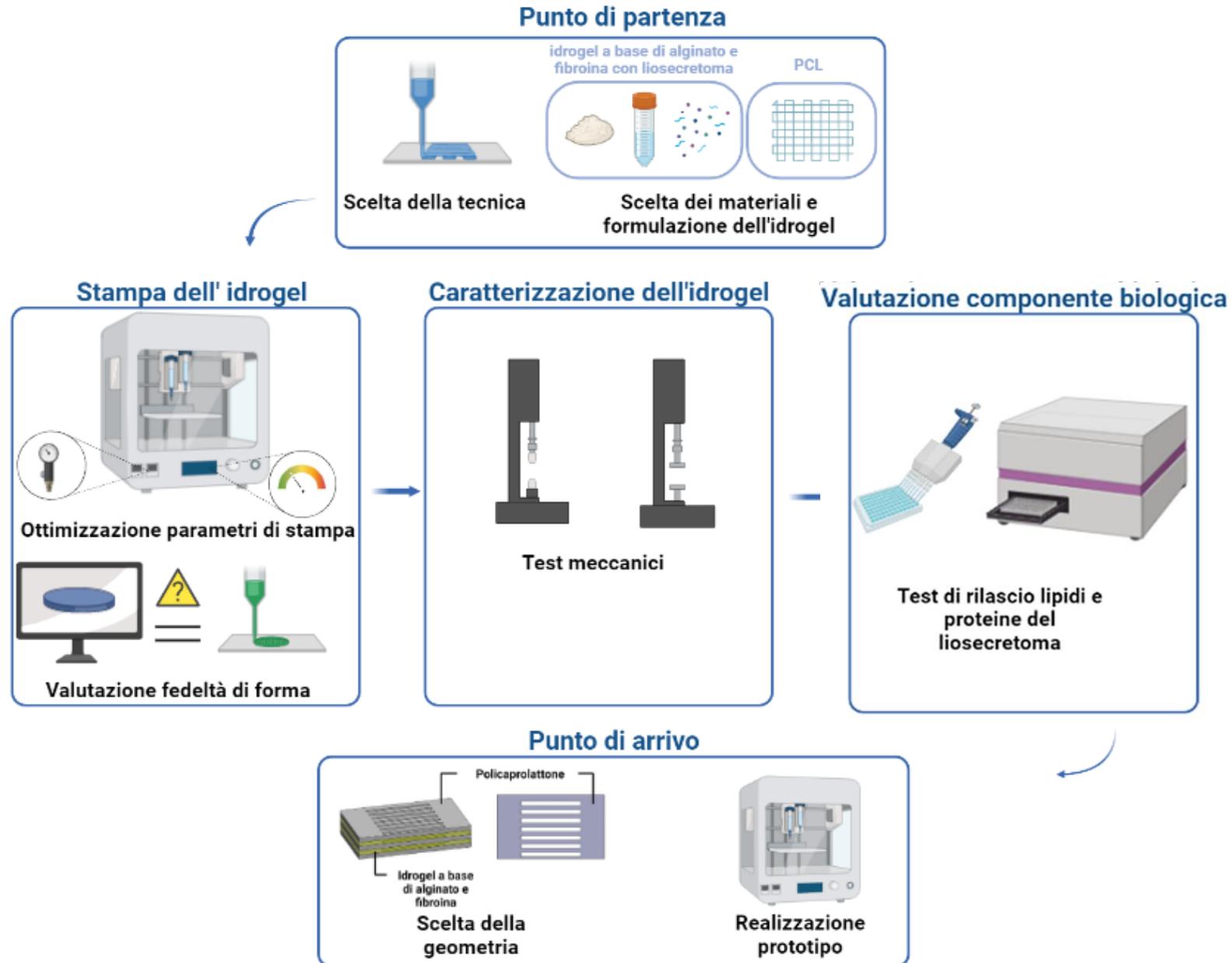


2 < N. campioni < 6

La fibroina **NON**  
aumenta la risposta  
a trazione dell'idrogel

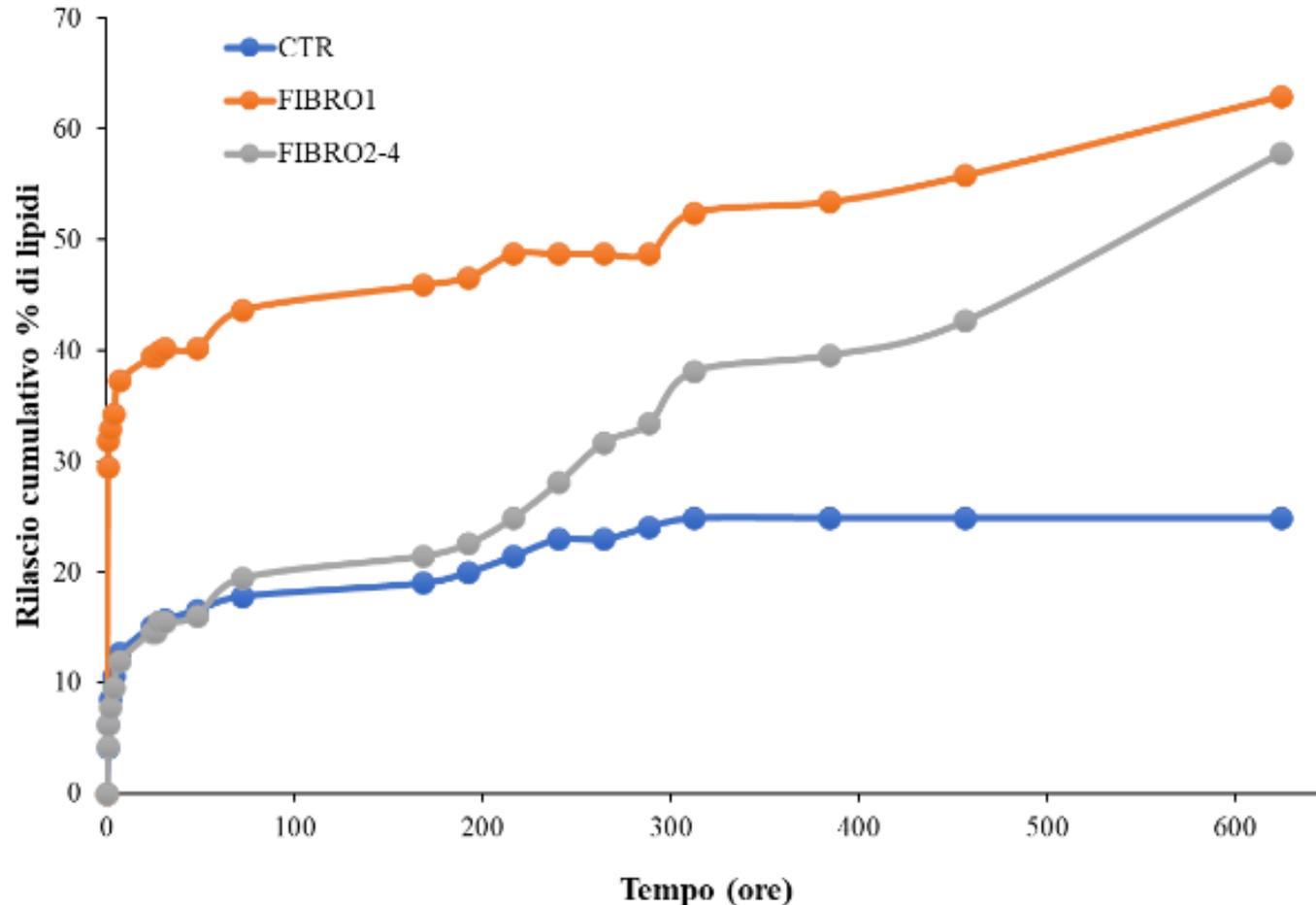


**Causa:** influenza del  
reticolante

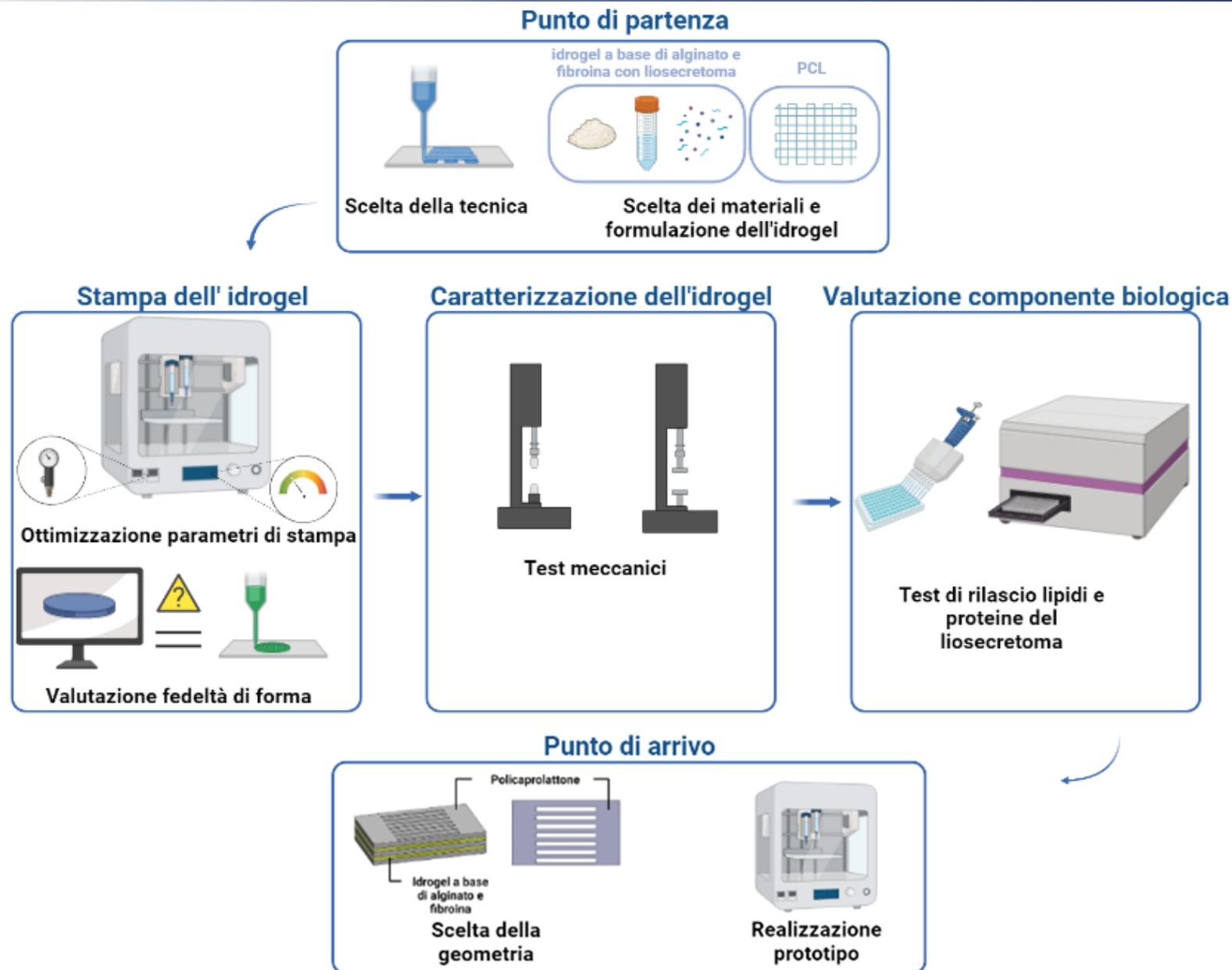


# Studio della componente biologica

Condotto dalla professoressa Torre e Elia Bari del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università del Piemonte Orientale e Sara Perteghella del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia



- Il lotto con fibroina sgommata 1 h è quello che presenta il rilascio più rapido
- I lotti con fibroina sgommata 2 h e 4 h non presentano differenze significative nella velocità di rilascio
- Il lotto con solo alginato è quello che rilascia meno velocemente

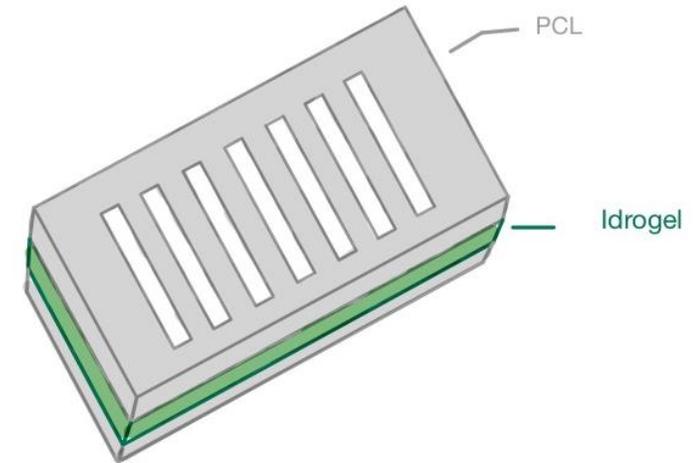


## Requisiti geometria:

- Anisotropia
- Resistenza meccanica

## Scelta della geometria\*:

- Geometria multistrato → alternanza di layer di PCL con layer di alginato (garantisce migliori proprietà meccaniche)
- Cavità parallele in ogni layer che garantiscono anisotropia



L = 55 mm



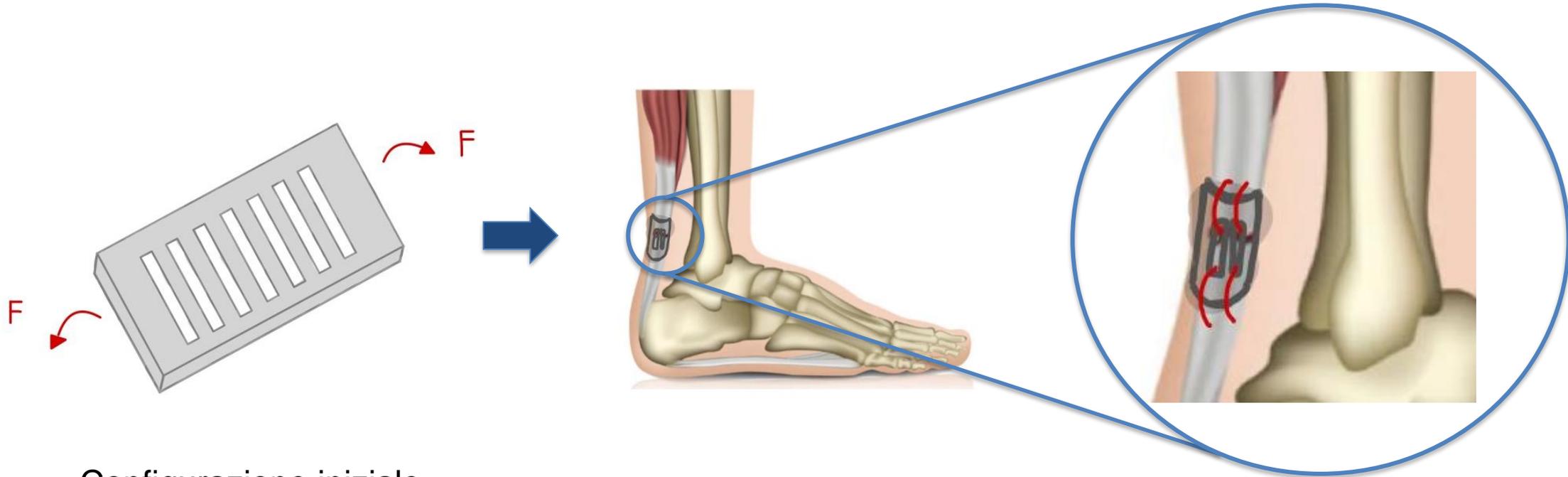
30 x 40 mm

## Scelta delle dimensioni

Tendine di riferimento: Tendine d'Achille

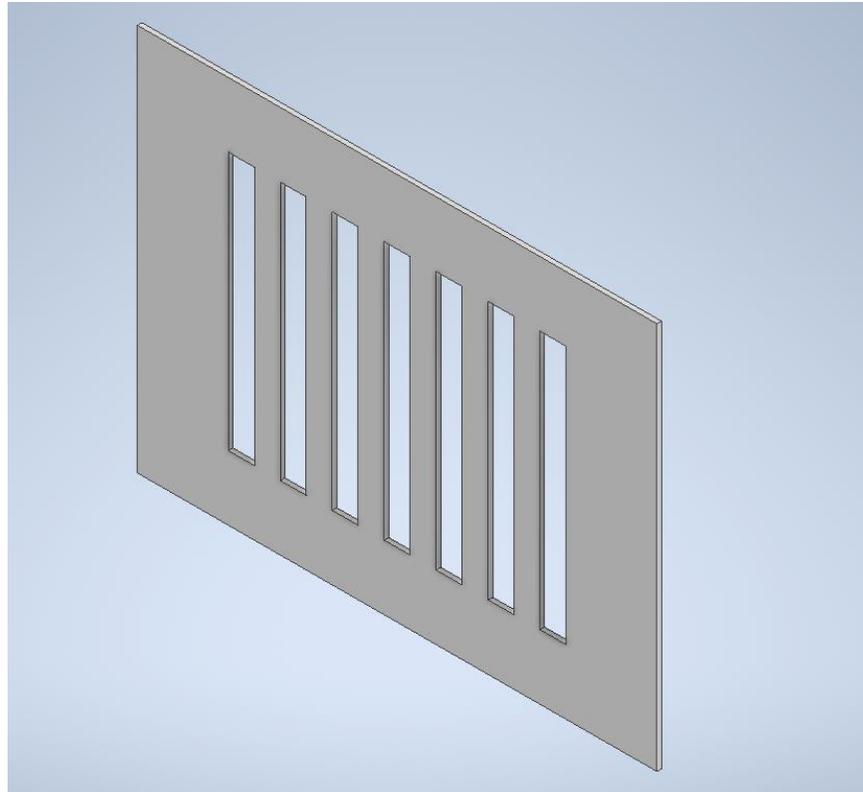
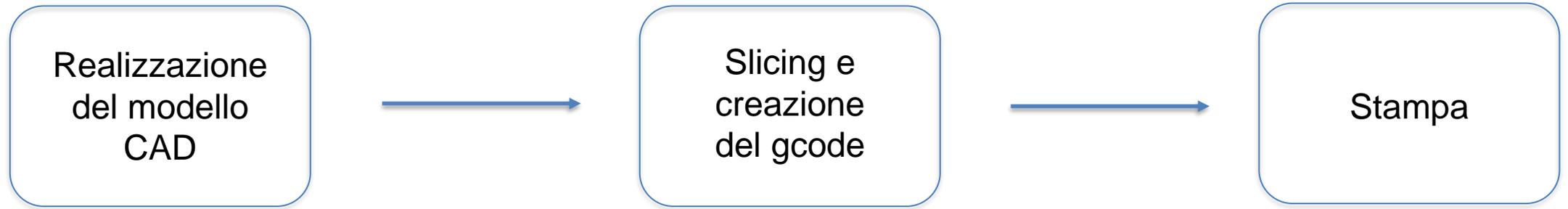
\* Xiping Jiang, Shaohua Wu, Mitchell Kuss, Yunfan Kong, Wen Shi, Philipp N. Streubel, Tieshi Li, Bin Duan, 3D printing of multilayered scaffolds for rotator cuff tendon regeneration, Bioactive Materials, Volume 5, Issue 3, 2020.

# Progettazione scaffold tendineo: posizionamento



Configurazione iniziale

Vengono applicate delle **forze** per flettere la struttura in maniera tale che vada ad abbracciare il tendine lesionato, al quale viene ancorata tramite dei fili di sutura



Realizzazione del singolo layer



Assemblaggio dei vari layer nella fase di slicing

Realizzazione  
del modello  
CAD



Slicing e  
creazione  
del gcode

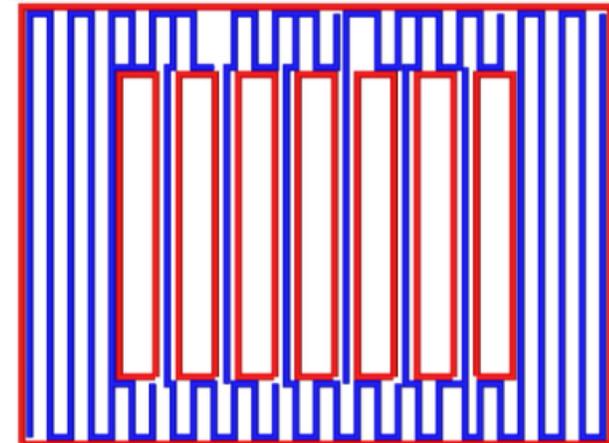


Stampa

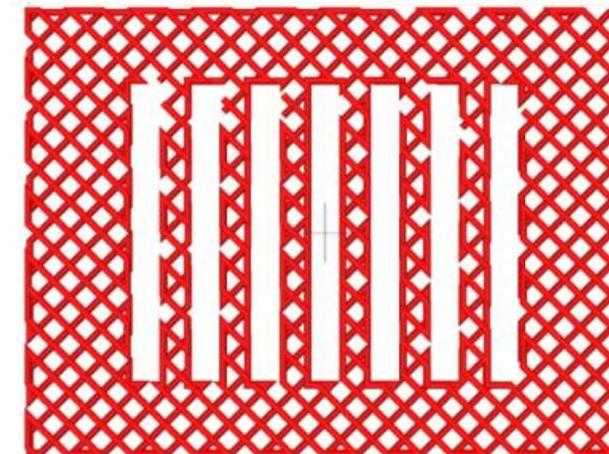
Non è possibile stampare un layer di  
PCL sopra un layer di idrogel



È necessario **creare un perimetro di  
PCL** intorno all'idrogel



Il layer di PCL deve garantire il  
contenimento dell'idrogel per evitare  
che questo vada a colare



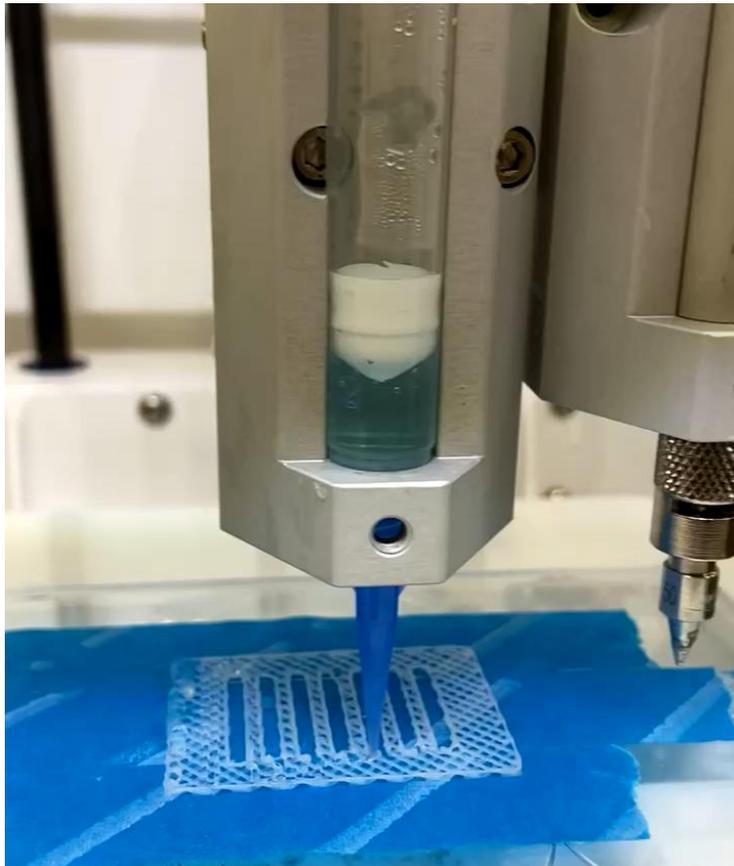
Realizzazione  
del modello  
CAD



Slicing e  
creazione  
del gcode

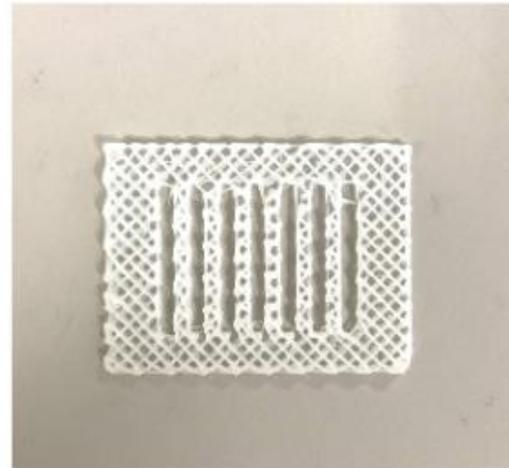


Stampa

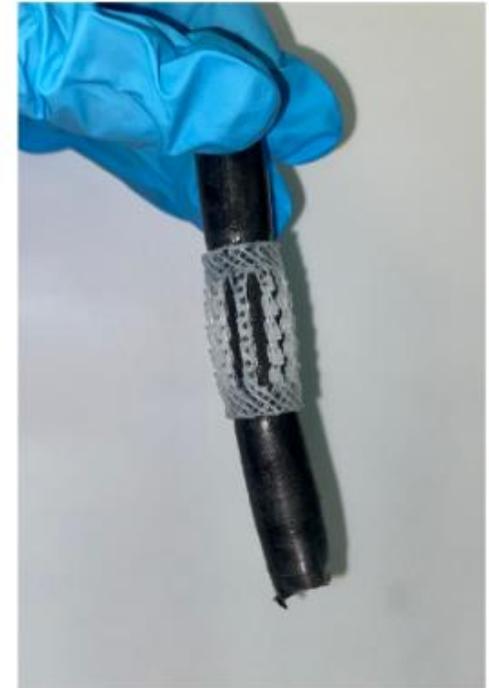


Processo di stampa

A)

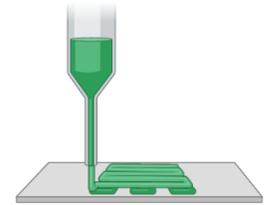


B)



- A) Struttura appena rimossa dal piatto di stampa
- B) Struttura ancorata ad un supporto che mima il Tendine d'Achille

- Si è riusciti a **formulare e caratterizzare un bioinchiostro** per l'ingegneria tissutale tendinea



- **Migliore stampabilità:** lotti con sgommatura 2 e 4 h stampati con ugello da 0.41 mm

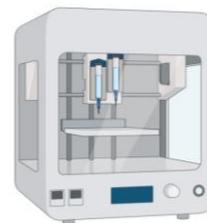


- **Proprietà meccaniche** dell'idrogel non paragonabili a quelle del tendine reale →

PCL

- Velocità di **rilascio** del liosecretoma in linea con quella ottenuta con l'idrogel di solo alginato, ottenendo però un rilascio cumulativo totale di lipidi maggiore

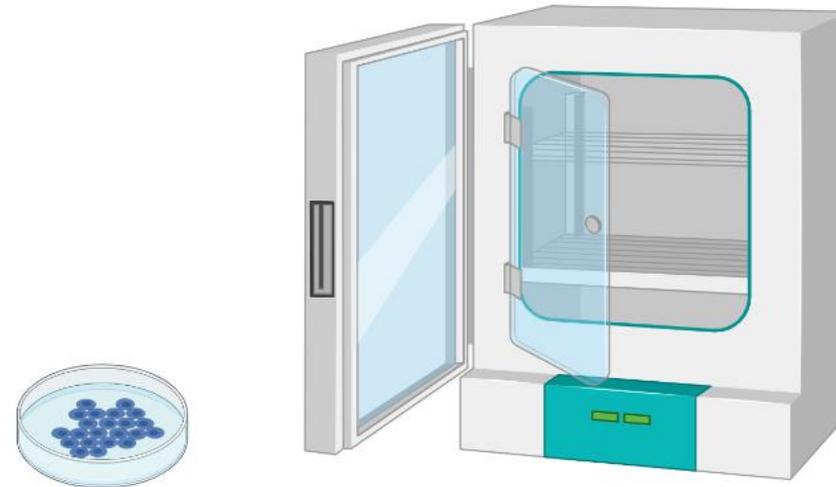
- **Formulazione dell'idrogel** scelta in base alla stampabilità e influenza sul rilascio del liosecretoma



- Ottimizzazione della geometria

The logo for SIMULIA ABAQUS, featuring a stylized 'S' symbol followed by the word 'SIMULIA' in a smaller font and 'ABAQUS' in a larger, bold font, all in a teal color.

- Caratterizzazione biologica



**Grazie per l'attenzione**