



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI

Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Settore Scientifico Disciplinare SSD CHIM/09

**PROGETTAZIONE, SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI
NUOVI DERIVATI POLISACCARIDICI E POLIURETANICI PER LA
PRODUZIONE DI BIOMATERIALI INNOVATIVI PROCESSABILI
CON STAMPANTE 3D AD ESTRUSIONE**

**IL DOTTORE
ANNALISA MARTORANA**

**IL COORDINATORE
CH.MO PROF. GIOVANNA PITARRESI**

**IL TUTOR
CH.MO PROF. GIOVANNA PITARRESI**

**IL CO TUTOR
CH.MO PROF. FABIO SALVATORE PALUMBO**

**CICLO - XXXIV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO - 2022**

Indice

1. Introduzione	1
1.1 La stampa e la biostampa 3D	1
1.2 Applicazioni della stampa e della biostampa 3D nella medicina	11
1.2.1 Applicazione: <i>Drug delivery</i>	12
1.2.2 Applicazione: <i>Drug screening</i>	13
1.2.3 Applicazione: <i>Tissue engineering</i>	15
1.3 <i>Bioink e biomaterial ink</i>	19
1.3.1 Gomma gellano	23
1.3.2 Acido ialuronico	33
1.4 Requisiti di un idrogel come <i>bioink</i>	39
1.5 Strategie di progettazione per stampa ad estrusione	45
1.5.1 Strategie nel <i>bioprinting</i> : Concentrazione del biomateriale	45
1.5.2 Strategie nel <i>bioprinting</i> : Uso di Nanoparticelle	46
1.5.3 Strategie nel <i>bioprinting</i> : Interazioni reversibili	49
1.5.4 Legami covalenti dinamici	51
1.5.5 HA-aldeide (HA-Ald) e vantaggi del suo uso come reticolante	55
1.5.6 Applicazione dell'HA: tessuto osseo e cartilagineo	57
1.6 Ulteriori strategie per migliorare la stabilità post-stampa	58
1.7 Modificazione chimica	59
1.8 Classificazione funzionale dei <i>bioinks</i>	60
1.9 Poliuretani	62
1.9.1 Poliuretani in ambito biomedicale	68
1.9.2 Poliuretani biodegradabili	69
1.9.3 Stampa 3D di Poliuretani	70
1.10 Esempi di applicazioni specifiche della stampa 3D nella rigenerazione tissutale: il tessuto osseo	72

1.11	Stampa 3D per la produzione di <i>scaffold</i> utili nel trattamento di patologie a carico del tessuto osseo: l'osteosarcoma	76
2.	Scopo della tesi	82
3.	Risultati e discussioni	86
3.1	Un nuovo <i>bioink</i> a base di un derivato della gomma gellano funzionalizzato con PLGA: sintesi, caratterizzazione e valutazione della stampabilità in 3D	86
3.1.1	Sintesi e caratterizzazione del copolimero GGm-PLGA	86
3.1.2	Prove reologiche	89
3.1.3	Preparazione e caratterizzazione dei films	95
3.1.4	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i>	100
3.1.5	3D <i>Bioprinting</i> : <i>Yield stress</i> e <i>Recovery time</i>	102
3.1.6	Prove di stampa e incorporazione delle cellule	104
3.2	Produzione, caratterizzazione chimicofisica, reologica e biologica di un <i>bioink</i> a base di un derivato amminico della gomma gellano	109
3.2.1	Sintesi e caratterizzazione del polimero GG-EDA	109
3.2.2	Preparazione e caratterizzazione delle dispersioni per la stampa (<i>inks</i>)	111
3.2.3	Caratterizzazione reologica degli <i>inks</i>	113
3.2.4	Studi di degradazione	117
3.2.5	Prove di stampa	118
3.2.6	Preparazione e caratterizzazione dei <i>bioinks</i>	120
3.2.7	Caratterizzazione reologica dei <i>bioinks</i>	120
3.2.8	Studi di crosslinking ionotropico dei <i>bioinks</i>	122
3.2.9	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i> dei <i>bionks</i>	124
3.3	<i>Bioink</i> di un derivato dell'acido ialuronico <i>self-healing</i> e pH sensibile: sintesi, caratterizzazione e stampabilità	126
3.3.1	Sintesi e caratterizzazione di HA-DETA	126
3.3.2	Studi turbidimetrici	128
3.3.3	Titolazione potenziometrica	129

3.3.4	Sintesi e caratterizzazione di HA-aldeide	131
3.3.5	Caratterizzazione SEC	133
3.3.6	Preparazione degli idrogeli e caratterizzazione reologica	134
3.3.7	<i>Swelling</i> e degradazione	137
3.3.8	Tempo di gelificazione	139
3.3.9	<i>Crosslinking efficiency</i> e caratterizzazione SEM	141
3.3.10	Proprietà <i>self-healing</i> degli idrogeli	142
3.3.11	Studio di pH sensibilità degli idrogeli	145
3.3.12	Citocompatibilità/studio della citotossicità	147
3.3.13	<i>3D printing</i>	148
3.3.14	HA-DETA come stabilizzante per la produzione di nanoparticelle di Ag	149
3.3.15	Sintesi e caratterizzazione dei materiali nanocompositi Ag/HA-DETA (senza riduzione UV)	150
3.3.16	Sintesi e caratterizzazione dei materiali nanocompositi Ag/HA-DETA _{UV} mediante fotoirradiazione UV	152
3.3.17	Analisi di microscopia a scansione e trasmissione elettronica (STEM)	156
3.3.18	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	157
3.3.19	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i>	158
3.3.20	Studi microbiologici: attività antibatterica ed antibiofilm	160
3.3.21	Preparazione degli idrogeli, studi di rilascio e test di diffusione su agar	163
3.4	<i>Solvent-casting 3D printing</i> di nuovi poliuretani con potenziale effetto rigenerativo del tessuto osseo e rilascio loco-regionale di doxorubicina	166
3.4.1	Sintesi dei copolimeri <i>tri-block</i>	166
3.4.2	Sintesi del <i>chain extender</i>	169
3.4.3	Caratterizzazione del tetrametilestere dell'L-glutazione ossidato	170
3.4.4	Sintesi dei poliuretani	172

3.4.5	Caratterizzazione chimico fisica dei PolyCEGS	173
3.4.6	Studi di degradazione e <i>swelling</i> su films di PolyC ₂₄ E _{1k} GS	177
3.4.7	Stampa 3D e modello digitale	178
3.4.8	Studi di degradazione e di <i>swelling</i> su <i>scaffolds</i> stampati	181
3.4.9	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i>	183
3.4.10	Incorporazione del farmaco e studi di rilascio	185
3.4.11	Studi di citotossicità <i>in vitro</i> e determinazione della concentrazione inibente 50 (IC ₅₀)	187
4.	Conclusioni	192
5.	Parte sperimentale	195
5.1	Un nuovo <i>bioink</i> a base di un derivato della gomma gellano funzionalizzato con PLGA: sintesi, caratterizzazione e valutazione della stampabilità in 3D	195
5.1.1	Materiali	195
5.1.2	Metodi	195
5.1.3	Degradazione della gomma gellano e produzione di gomma gellano (peso molecolare medio) sale di tetrabutilammonio	196
5.1.4	Sintesi e caratterizzazione del derivato poli(lattide-co-glicolide)-etilendiammina (PLGA-EDA)	197
5.1.5	Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri GGm- <i>graft</i> -PLGA-EDA	197
5.1.6	Studi reologici	198
5.1.7	Preparazione dei films	199
5.1.8	Studi di <i>swelling</i>	199
5.1.9	Studi di degradazione	200
5.1.10	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i>	200
5.1.11	<i>Yield stress e Recovery test</i>	201
5.1.12	Preparazione del <i>bioink</i> , incapsulazione cellulare e prove di stampa 3D	202
5.1.13	Analisi statistica	203

5.2	Produzione, caratterizzazione chimico-fisica, reologica e biologica di un <i>bioink</i> a base di un derivato amminico della gomma gellano	204
5.2.1	Materiali	204
5.2.2	Metodi	204
5.2.3	Sintesi del derivato della gomma gellano, GG-EDA	205
5.2.4	Preparazione e caratterizzazione della dispersione per stampa (<i>ink</i>)	205
5.2.5	Caratterizzazione reologica degli <i>inks</i>	206
5.2.6	Studi di degradazione	207
5.2.7	Prove di stampa	208
5.2.8	Preparazione e caratterizzazione dei <i>bioinks</i>	208
5.2.9	Analisi statistica	210
5.3	<i>Bioink</i> di un derivato dell'acido ialuronico <i>self-healing</i> e pH sensibile: sintesi, caratterizzazione e stampabilità	211
5.3.1	Materiali	211
5.3.2	Metodi	211
5.3.3	Sintesi HA-DETA e caratterizzazione	212
5.3.4	Degradazione acido ialuronico ad alto peso molecolare	212
5.3.5	Sintesi e caratterizzazione del derivato dietilentriamminico dell'acido ialuronico (HA-DETA)	213
5.3.6	Studi turbidimetrici	213
5.3.7	Titolazione potenziometrica	214
5.3.8	Sintesi e caratterizzazione del derivato aldeidico dell'acido ialuronico (HA-Ald)	214
5.3.9	Caratterizzazione mediante <i>Size-exclusion chromatography</i> (SEC)	215
5.3.10	Preparazione degli idrogeli	215
5.3.11	Tempo di gelificazione	216
5.3.12	<i>Crosslinking efficiency</i>	216
5.3.13	Studi reologici	217

5.3.14	<i>Studi di swelling</i>	217
5.3.15	Determinazione del grado di degradazione dello <i>scaffold</i>	218
5.3.16	Proprietà <i>self-healing</i>	218
5.3.17	Studio della pH sensibilità	219
5.3.18	Citocompatibilità	219
5.3.19	<i>3D printing</i>	220
5.3.20	Produzione <i>in situ</i> delle nanoparticelle di argento (AgNPs): Sintesi dei materiali nanocompositi Ag/HA-Deta (senza riduzione UV)	221
5.3.21	Produzione <i>in situ</i> delle nanoparticelle di argento (AgNPs): Sintesi di composti Ag/HA-DETA_UV mediante fotoirradiazione UV	221
5.3.22	Caratterizzazione chimico-fisica dei nanocompositi	222
5.3.23	Attività antibatterica e proprietà <i>antifouling</i> del derivato HA-DETA ₃₃	222
5.3.24	Attività antimicrobica dei nanocompositi Ag/HA-DETA_uv	223
5.3.25	Inibizione formazione di biofilm di Ag10/HA-DETA_uv	223
5.3.26	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i> dei nanocompositi	224
5.3.27	Preparazione degli idrogeli AgNPs/HA-DETA/HA-Ald	225
5.3.28	Studi di rilascio di argento	225
5.4	<i>Solvent-casting 3D printing</i> di nuovi poliuretani con potenziale effetto rigenerativo del tessuto osseo e rilascio loco-regionale di doxorubicina	226
5.4.1	Materiali	226
5.4.2	Sintesi dei copolimeri <i>tri-block</i> PolyCE	226
5.4.3	Sintesi del <i>Chain extender</i>	227
5.4.4	Sintesi dei poliuretani	227
5.4.5	Caratterizzazione	228
5.4.6	Studi di degradazione idrolitica	229
5.4.7	Stampa dei poliuretani	230
5.4.8	Studi di degradazione idrolitica sugli <i>scaffolds 3D printed</i>	230
5.4.9	Studi di citocompatibilità <i>in vitro</i>	231

5.4.10 Caricamento di Doxorubicina e studi di rilascio	232
5.4.11 Studi di citotossicità <i>in vitro</i> e determinazione della concentrazione inibente 50 (IC ₅₀)	232
6. Bibliografia	234

1. Introduzione

1.1 La stampa e la biostampa 3D

Il termine stampa tridimensionale, o Manifattura Additiva, conosciuta anche come *Additive Manufacturing* (AM) o stampa 3D, si riferisce ad una modalità produttiva che consente la realizzazione di oggetti, utilizzando tecniche diverse tra loro, ma che si basano principalmente sulla deposizione di strati di materiale, in cui una struttura viene costruita depositando strati successivi per produrre un oggetto 3D (O'Brien, et al., 2015). Ciò contrasta con quanto accade nelle tecniche di produzione tradizionale, note anche come *Subtractive Manufacturing*, tipicamente utilizzate in campo ingegneristico, in cui si procede per “sottrazione da pieno” tramite processi di lavorazione come fresatura, perforazione o tornitura. L'approccio pratico dell'AM si chiama *prototipazione rapida* (RP) e i suoi vantaggi includono la riduzione dei tempi e dei costi di prototipazione, la facilità nell'apportare modifiche in un prodotto a livello di progetto, la possibilità di fabbricazione di piccoli oggetti o prodotti personalizzati in serie o strutture impossibili da formare con tecniche sottrattive. Il processo di stampa viene preceduto da una fase fondamentale, nota come modellazione, che comprende, principalmente, l'acquisizione di immagini tridimensionali o la progettazione digitale 3D e la selezione dei materiali in base alla tecnica di stampa utilizzata (Murphy & Atala, 2014).

Il modello digitale della struttura desiderata viene creato con precisione mediante un programma di progettazione assistito da computer (CAD) e poi esportato in un *file* di tipo *.stl, (stereolitografia), *.obj, (oggetto) o *.amf (*file* di produzione additiva). Viene poi utilizzato un altro *software*, generalmente noto come "*slicer*" (affettatrice), per convertire i dati 3D dell'oggetto solido in “fette”, cioè sezioni trasversali sottili (Sears, et al., 2016). Ogni sezione 2D viene poi integrata con i vari modelli di riempimento, come era stato programmato. In questa fase, la stampante deposita strati successivi di biomateriale; dunque il modello 3D viene ottenuto dalla sovrapposizione delle sezioni trasversali 2D (Cui, et al., 2017).

Sono diverse le strategie e le tecnologie utili alla produzione di dispositivi 3D, tra queste, la *fused deposition modeling* (FDM) si distingue come la procedura più popolare per la fabbricazione di prodotti 3D con una risoluzione spaziale fino a 45 µm (Yamada, et al., 2008).

Questa tecnica, tra le più utilizzate, si è sviluppata agli inizi degli anni '90 ed è basata sull'estrusione di polimeri termoplastici (O'Brien, et al., 2015; Do, et al., 2015; Gu, et al., 2016). Il processo di stampa avviene per fusione del polimero, il quale, estruso attraverso un ugello, solidifica, durante la fase di deposizione, senza necessità di un processo di reticolazione (O'Brien, et al., 2015; Melchels, et al., 2012).

La stampante utilizzata per l'FDM è composta da blocchi di riscaldamento con controllo della temperatura e un ugello per l'estrusione (Figura 1) (Stansbury & Idacavage, 2016).

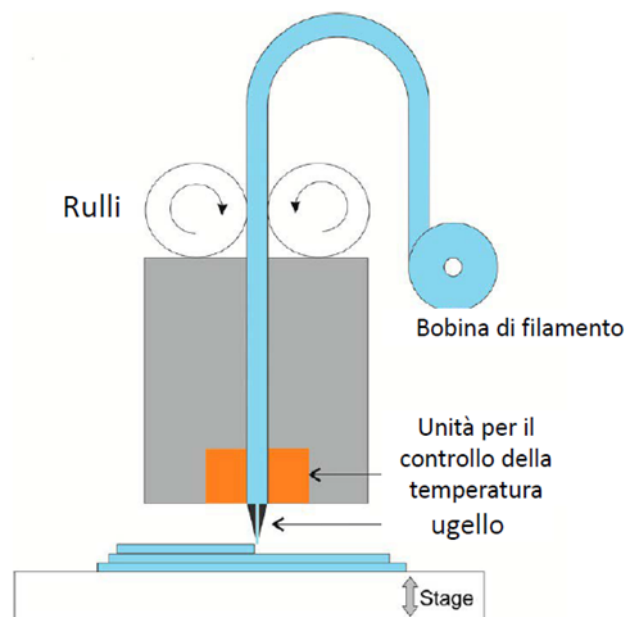


Figura 1. Schema stampante 3D FDM (Gross, et al., 2014)

Possono essere utilizzate più testine di stampa per consentire l'estrusione simultanea di più biomateriali, ad esempio materiali di supporto temporaneo per sostenere le strutture in costruzione, oppure l'integrazione di materiali diversi tra loro per garantire adeguate proprietà al costruito stampato (Cui, et al., 2017).

I principali vantaggi dell'FDM nelle applicazioni in campo biomedico sono correlati alla semplicità di impiego, rapidità di stampa, basso costo, disponibilità di biomateriali sintetici diversi, proprietà meccaniche favorevoli, un'alta risoluzione finale e alla possibilità di fabbricare costrutti di dimensioni anatomicamente rilevanti (O'Brien, et al., 2015; Cui, et al., 2017).

Diversi biomateriali sintetici, come il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA) e i poliuretani, sono stati impiegati per la stampa FDM, in quanto sono polimeri termoplastici e biocompatibili (Stansbury & Idacavage, 2016). E' necessario infatti

che i materiali impiegati nella stampa FDM possano essere fusi e successivamente solidificati o reticolati termicamente (Holmes, et al., 2015). L'uso di questa tecnica è limitata alla selezione dei polimeri termoplastici utilizzabili (Cui, et al., 2017) e dalle alte temperature utilizzate che non consentono la simultanea estrusione di biomateriali e cellule durante la fase di stampa. Inoltre, la degradazione termica causata dalle alte temperature di lavorazione e dall'elevata viscosità della maggior parte dei polimeri fusi può impedire che l'applicazione di questa tecnica sia compatibile con l'utilizzo di nanocompositi, poiché le nanoparticelle possono aumentare in modo significativo la viscosità del materiale.

Tuttavia, nella traslazione della stampa 3D nel campo medico e farmaceutico è necessario operare a temperature moderate, per non innescare processi di degradazione o decomposizione di sostanze attive o di biomateriali. Una tecnica vantaggiosa nell'ambito della stampa dei materiali polimerici è la *solvent-cast direct-write* (SC-DW), rappresentata in Figura 2.

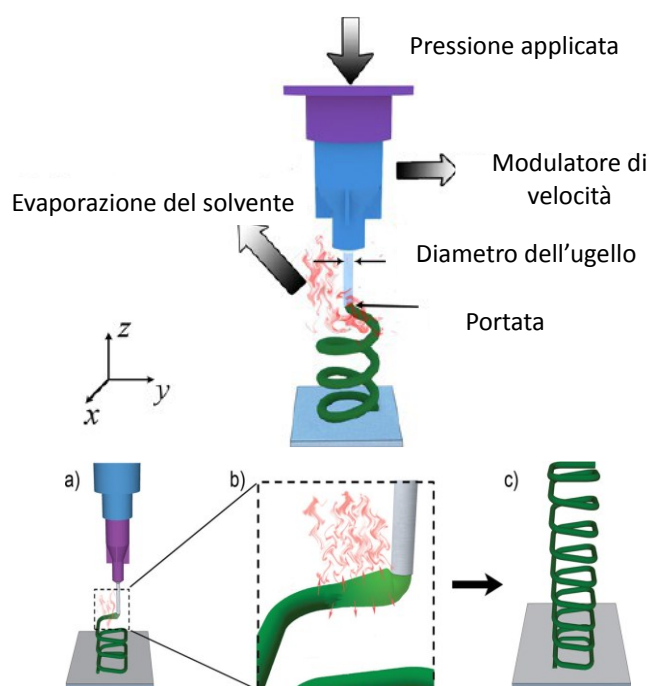


Figura 2. Rappresentazione schematica del processo SC-DW con una soluzione termoplastica. a) Deposizione della soluzione polimerica attraverso un micro-ugello. b) Evaporazione rapida del solvente dopo l'estrusione. c) Esempio di una spirale quadrata 3D fabbricata tramite la tecnica SC-DW (Guo, et al., 2013)

Questo metodo permette di produrre strutture 3D a temperatura ambiente utilizzando polimeri termoplastici disperdibili in solvente organico. Il metodo consiste nella microestrusione sotto pressione di un filamento di inchiostro in dispersione polimerica

concentrata, combinato con una rapida evaporazione del solvente. Man mano che il solvente evapora dopo l'estrusione, il diametro del filamento diminuisce e la sua rigidità aumenta gradualmente nel tempo grazie ad una concentrazione di polimero localmente più alta e la rigidità del filamento estruso cambia da fluida a solida, il che facilita il mantenimento della forma.

Il solvente selezionato e la concentrazione di polimero nella dispersione devono essere impostati per garantire l'ideale comportamento reologico dell'inchiostro fornendo al contempo una rapida evaporazione del solvente. Quindi, la velocità di estrusione e la pressione applicata sulla dispersione polimerica devono essere adattate per ottenere la portata lineare desiderata del materiale (Guo et al., 2013).

Purtroppo, come quelle appena descritte, la maggior parte delle tecniche di stampa 3D utilizzano solventi tossici, alte temperature e raggi laser UV rendendole, pertanto, inadatte alla costruzione di tessuti funzionali e limitando le loro applicazioni in campo medico (Lee & Dai, 2016). La stampa 3D configura un nuovo processo di biofabbricazione che ha trovato largo impiego nel settore dell'ingegneria tissutale (TE) nella rigenerazione o sostituzione di tessuti o organi danneggiati. Nel corso degli anni, infatti, diverse tecniche di stampa 3D sono state applicate per fabbricare costrutti tridimensionali, utilizzando un'ampia varietà di biomateriali e superando i limiti dei metodi tradizionali (come il *solvent-casting*, il *particle-leaching*, il *gas-foaming*, e il *compression-molding* (Tsang & Bhatia, 2006)) utilizzati in TE non in grado di riprodurre la complessità del tessuto nativo (Hutmacher, et al., 2004; Jung, et al., 2015). La stampa 3D ha permesso di superare le limitazioni e recenti progressi tecnici hanno consentito di includere le cellule viventi nel processo di stampa, mantenendo tutti i vantaggi della stampa 3D convenzionale (Murphy & Atala, 2014; Derby, 2012; Knowlton, et al., 2015).

Si assiste così all'evoluzione biologica di questa tecnica: il *3D bioprinting* che sfrutta la stampa 3D per consentire la deposizione tridimensionale e la stratificazione sequenziale di cellule incapsulate in biomateriali, definiti *bioink*. Questa tecnica comporta la deposizione strato per strato del *bioink* o bioinchiostro, il materiale stampato, di cui parleremo in seguito, fino all'ottenimento della struttura tridimensionale (Figura 3) (Holzl, et al., 2016).

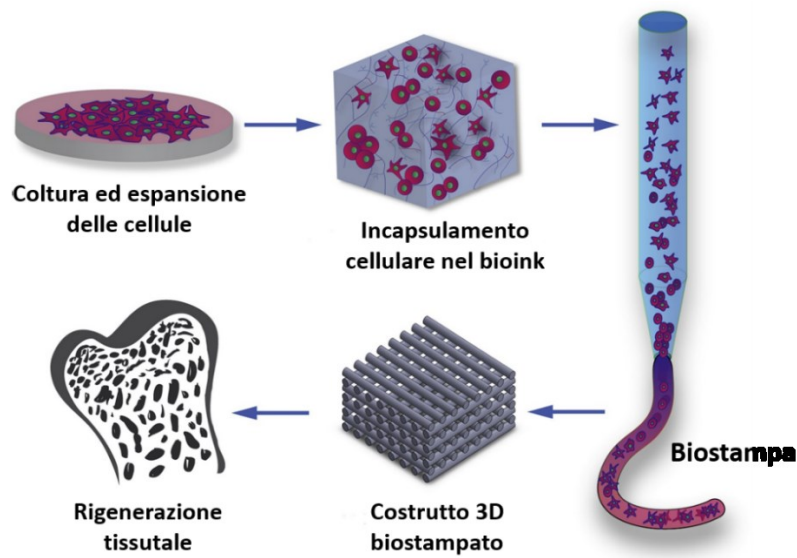


Figura 3. Schematizzazione del processo di biostampa, dalla coltura cellulare in vitro alla rigenerazione tissutale in vivo (Cidonio, et al., 2019)

Il processo di biostampa consiste di tre fasi: *pre-bioprinting*, *bioprinting* e *post-bioprinting* (Figura 4).



Figura 4. Fasi del processo di biostampa

La fase di *pre-bioprinting* ha un ruolo estremamente cruciale nel determinare le proprietà dei costrutti finali. In particolare, è fondamentale per l'ottenimento di modelli di tessuto anatomicamente corretti e per la pianificazione del processo di stampa. Il processo di stampa consiste nella deposizione del bioinchiostro *layer by layer* (strato per strato) utilizzando un'adeguata biostampante. Infine, la fase di *post-bioprinting* viene eseguita in condizioni strettamente controllate che simulano l'ambiente *in vivo*, permettendo la maturazione del tessuto stampato; a tale scopo

vengono impiegati i bioreattori (Datta, et al., 2018). Nello specifico, nella fase che precede il processo di biostampa, per raccogliere e digitalizzare le informazioni tomografiche e architettoniche delle complesse strutture tissutali, vengono utilizzate diverse tecniche di *imaging*, come la radiografia a raggi X, lo scanner 3D, la risonanza magnetica e la tomografia microcomputerizzata (Hutmacher, et al., 2004; Seol, et al., 2012).

A seconda degli stimoli impiegati per consentire la deposizione del bioinchiostro, si distinguono quattro metodi principali di biostampa 3D: la stereolitografia, la biostampa a getto d'inchiostro, la biostampa laser assistita e la biostampa ad estrusione (Heinrich, et al., 2019b).

Quest'ultima, tecnica più popolare di *bioprinting* (Ozbolat & Hospodiuk, 2016) (ed è su questa che ci soffermeremo in questa tesi di dottorato) si è sviluppata rapidamente negli ultimi anni (Heinrich, et al., 2019b) grazie alla possibilità di stampare idrogeli di viscosità variabile (dove per viscosità si intende la resistenza di un *bioink* ad una forza di deformazione) e realizzare modelli tridimensionali su larga scala con densità cellulari elevate.

Il processo di estrusione utilizza una metodica di erogazione del materiale grazie ad un'attivazione meccanica o pneumatica che spinge attraverso l'ugello il *bioink* caricato in siringa (Ozbolat & Hospodiuk, 2016)

Nello specifico, i sistemi a base pneumatica (Figura 5) utilizzano aria pressurizzata per estrarre i filamenti di bioinchiostro e possono essere sia senza valvole che a valvole (si tratta di dispositivi elettromeccanici che regolano la pressione applicata) (Ozbolat & Hospodiuk, 2016). I sistemi senza valvole sono più facili da produrre e sono quindi più comunemente impiegati nella biostampa. Rispetto ai sistemi senza valvole, quelli basati sulla presenza di valvole possono controllare la pressione e le frequenze degli impulsi, consentendo così un'elevata precisione della deposizione del bioinchiostro e dando luogo alla formazione di costrutti caratterizzati da un'alta risoluzione (Heinrich, et al., 2019b; Khalil, et al., 2005).

I sistemi meccanici forniscono un metodo più semplice e diretto per il processo di stampa e sono controllati principalmente da un pistone o da una vite (Figura 5). I sistemi a pistone permettono il controllo diretto della deposizione del bioinchiostro sulla piattaforma e sono adatti principalmente ai fluidi a bassa viscosità. I sistemi a vite, invece, sono in grado di generare una pressione maggiore e sono impiegati preferibilmente per l'estrusione dei bioinchiostri con viscosità più elevate (Heinrich,

et al., 2019b; Ozbolat & Hospodiuk, 2016). Tuttavia, a causa delle maggiori forze di taglio all'uscita dell'ugello, i sistemi a vite possono risultare dannosi per le cellule (Ozbolat & Hospodiuk, 2016).

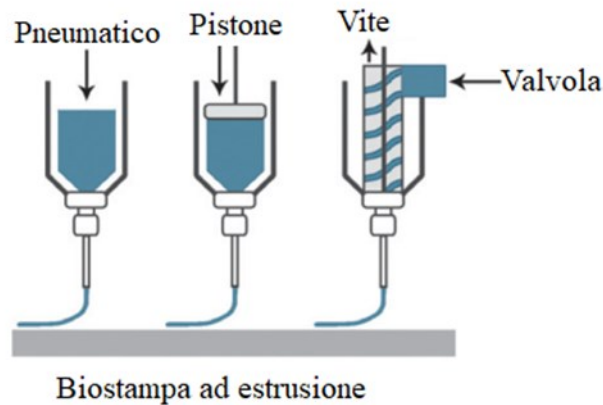


Figura 5. Illustrazione schematica dei sistemi a base pneumatica, a pistone e a vite (Malda, et al., 2013)

Durante la fase di biostampa, il *bioink* viene estruso sotto forma di filamenti cilindrici; la deposizione continua fornisce una migliore integrità strutturale durante la fabbricazione (Cui, et al., 2017). I biocostrutti 3D finali sono ottenuti utilizzando un approccio *layer by layer*, in cui lo strato precedentemente depositato serve come base per lo strato successivo.

Sono stati sviluppati diversi sistemi per la biostampa basata sull'estrusione, in generale, le biostampanti sono costituite da una piattaforma e da un sistema di dosaggio dei fluidi robotizzati lungo i 3 assi (x, y e z) (Lee & Dai, 2016). In particolare, prima del processo di stampa, il biomateriale contenente o meno le cellule (Pati, et al., 2016) sotto la pressione costante che viene man mano esercitata, vengono depositati come filamenti continui di bioinchiostro (Lee & Dai, 2016). La quantità di bioinchiostro erogato può essere regolata controllando la pressione pneumatica o meccanica applicata, la dimensione dell'ugello e la velocità di movimento dell'ugello (Khalil & Sun, 2009).

Le stampanti ad estrusione permettono di stampare contemporaneamente diversi bioinchiostri, dosati con un sistema di microestrusione, grazie alla presenza di più cartucce. Il processo di stampa può essere controllato da diversi parametri, quali la procedura di erogazione impiegata, la velocità di fuoriuscita del bioinchiostro, la dimensione dell'ugello, lo spostamento della cartuccia e/o dal movimento della piattaforma sugli assi x, y e z (Cui, et al., 2017). Inoltre, sono state sviluppate diverse tecniche avanzate che utilizzano per esempio ugelli a temperatura controllata, ugelli a

controllo direzionale e sistemi di ugelli coassiali (Murphy & Atala, 2014; Ozbolat & Hospodiuk, 2016; Ozbolat, et al., 2014).

Rispetto alle altre metodiche, la biostampa basata sull'estrusione presenta diversi vantaggi, tra cui la capacità di depositare bioinchiostri ad alta viscosità (da 30 mPa s a $> 6 \times 10^7$ mPa s) così come grandi densità di cellule ($> 1 \times 10^8$ cellule/ml) (Mandrycky, et al., 2016; Murphy, et al., 2013). Inoltre, l'estrusione dei filamenti di bioinchiostro può avvenire continuamente senza interruzioni e questo, nella maggior parte delle applicazioni, è preferibile rispetto ad altre tecniche che prevedono la deposizione a goccia, in quanto fornisce un'adeguata integrità dei costrutti finali (Heinrich, et al., 2019b). Inoltre, la biostampa ad estrusione consente una stampa rapida, un funzionamento semplice e un'ampia selezione di bioinchiostri utilizzabili, compresi aggregati cellulari, idrogeli caricati con cellule, matrici decellularizzate e fibre polimeriche sintetiche. Nel complesso, le tecniche basate sull'estrusione sono caratterizzate da una maggiore velocità di deposizione e di stampa e consentono l'impiego di densità cellulari fisiologicamente rilevanti che contribuiscono alla scalabilità di questa metodica (Cui, et al., 2017).

Diversi studi hanno dimostrato che la vitalità delle cellule, a seguito del processo di biostampa basato sull'estrusione, è di solito moderata a circa 40-86%, ciò è dovuto alle elevate sollecitazioni di taglio subite dalle cellule durante la fase di estrusione (Mandrycky, et al., 2016; Ozbolat & Hospodiuk, 2016) e il tasso di sopravvivenza delle cellule potrebbe diminuire con l'aumento della pressione di estrusione (Nair, et al., 2009; Chang, et al., 2008). Nonostante ciò, la biostampa basata sull'estrusione è stata finora una delle tecniche più ampiamente impiegate nell'ambito dell'ingegneria tissutale per la sua relativa semplicità nella strumentazione e per la sua capacità di depositare materiali multipli con proprietà ad ampio spettro (Sears, et al., 2016; Heinrich, et al., 2019b).

Sebbene la risoluzione dei costrutti ottenuti con questa tecnica sia inferiore rispetto a quella che si ha con altri tipi di tecniche di stampa, come la biostampa assistita da laser oppure la biostampa a getto d'inchiostro, la biostampa basata sull'estrusione ha consentito la realizzazione rapida di costrutti 3D clinicamente rilevanti per l'ingegneria tissutale (Park, et al., 2016b).

Ad oggi la stampa 3D rappresenta una tecnologia in costante evoluzione e i ricercatori sono continuamente alla ricerca di nuove tecniche di stampa per superare i limiti delle metodologie attuali e per espandere ulteriormente le applicazioni nel campo

dell'ingegneria tissutale e del drug delivery. La maggior parte delle tecniche di biostampa di nuova concezione sono variazioni o combinazioni delle tecnologie esistenti (Lee & Dai, 2016).

Recentemente, è stato osservato in molti studi che un bagno di supporto può essere utile per sospendere le fragili strutture durante la stampa (Highley, et al., 2015; Hinton, et al., 2015). Poiché in genere vengono impiegati bioinchiostri meccanicamente deboli, la forza di gravità, nel tempo, potrebbe deformare la struttura del costruito 3D. In particolare, il bagno di supporto deve possedere caratteristiche tissotropiche. Inoltre può essere introdotto un *crosslinker* nel bagno di supporto per reticolare le macromolecole del bioinchiostro, in modo tale da stabilizzare ulteriormente la struttura tridimensionale stampata (Jang, et al., 2018).

Per esempio, Hinton e coll. hanno sviluppato un processo di stampa utilizzando polimeri naturali (p.es. collagene, fibrinogeno e acido ialuronico) e un bagno di supporto di gelatina sacrificale che funge da momentaneo supporto al bioinchiostro che viene iniettato, per poi essere eliminato aumentando la temperatura fino a 37°C, liquefacendo così la gelatina. Questa procedura ha consentito la realizzazione di costrutti 3D complessi (Hinton, et al., 2015).

Un altro metodo di stampa, studiato di recente, è la cosiddetta estrusione coassiale. Si tratta di un'applicazione della stampa per microestrusione in cui si utilizza una testina di stampa costituita da due aghi, uno più piccolo interno e l'altro esterno più grande in posizione coassiale. Impiegando questa tecnica si possono realizzare varie strutture utilizzando materiali differenti per gli aghi esterni e per quelli interni (Gao, et al., 2015b; Colosi, et al., 2016; Yu, et al., 2014).

Un altro esempio di metodica avanzata è la biostampa 4D che ha origine dalla biostampa tridimensionale, ma è integrata da una quarta dimensione che è quella del tempo (Tibbits, 2014; Ge, et al., 2013). Dal momento che le funzioni dei tessuti umani sono spesso basate su cambiamenti dinamici, comunemente indotti da stimoli esterni che si verificano nella conformazione del tessuto, risulta necessario ottenere la stampa di modelli più realistici (Li, et al., 2016; Marieb & Hoehn, 2010). Nella biostampa 4D, la costruzione biostampata 3D può cambiare la sua forma o struttura con il tempo, in particolare quando viene sottoposta a stimoli esterni (Figura 6) (Choi, et al., 2015). Gli stimoli possono includere la presenza di acqua, il pH, la temperatura, l'elettricità, la forza ionica, la luce, il campo magnetico, la pressione, le onde acustiche e le loro combinazioni (Yang, et al., 2017). L'elemento cruciale di questo processo di stampa è

il biomateriale “intelligente” che deve essere programmabile con precisi stimoli (Khoo, et al., 2015).

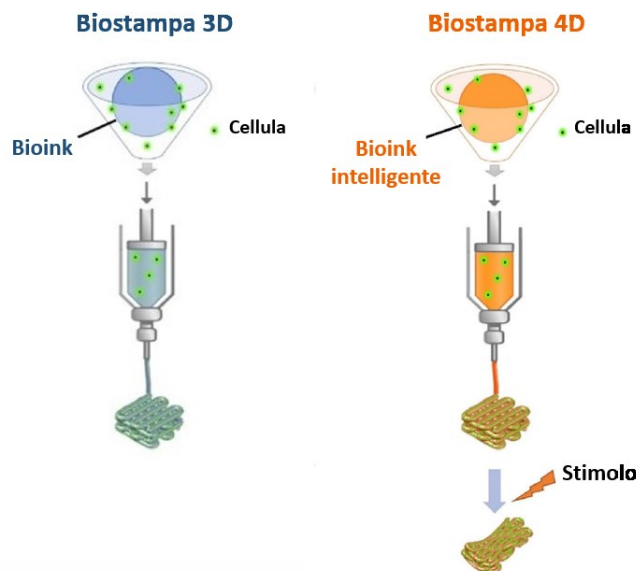


Figura 6. Illustrazione schematica dei processi di biostampa 3D e biostampa 4D (Li, et al., 2020a)

Infine, oltre agli approcci convenzionali basati sulla realizzazione di costrutti tissutali che vengono successivamente impiantati nell'organismo, la biostampa *in situ* offre una nuova strategia in grado di favorire il posizionamento di tessuto artificiale nel tessuto endogeno che presenta un difetto (Ozbolat, 2015a). I dispositivi di biostampa *in situ* hanno un alto potenziale, in particolare, per trattare i difetti della pelle, delle ossa e della cartilagine, utilizzando i tessuti endogeni circostanti per integrare i bioinchiostri depositati e per rigenerare i tessuti danneggiati (Heinrich, et al., 2019b).

Il *bioprinting in situ* si basa, dunque, sulla stampa diretta di *bioinks* nei tessuti danneggiati (Campbell & Weiss, 2007). Questo nuovo paradigma funziona sulla premessa che i tessuti sostitutivi non devono essere fabbricati esternamente ma possono essere creati direttamente all'interno di un sito difettoso. Mentre il *bioprinting* a getto d'inchiostro *in situ* è stato utilizzato per il trattamento dei difetti della pelle (Skardal, et al., 2012), il metodo ad estrusione è stato applicato per la riparazione della pelle e della cartilagine. Connell e coll. hanno fabbricato un sistema di estrusione portatile (Biopen), costituito da un sistema pneumatico che controlla l'estrusione di due *bioinks* (O'Connell, et al., 2016). L'estrusione da entrambe le camere dei *bioinks* e la polimerizzazione UV sono state controllate in maniera indipendente tramite attuatori separati. I materiali per la stampa *in situ* sono simili a quelli del *bioprinting*

ad estrusione tradizionale. Le proprietà di assottigliamento al taglio, rigidità, diffusività, compatibilità cellulare, biodegradabilità e velocità di gelificazione del *bioink* giocano un ruolo chiave nel successo di tale approccio. In un altro esempio, Russel e coll. hanno sviluppato una stampante portatile simile ad una penna che è stata utilizzata per la deposizione di *bioink* a base di gelatina metacrilata (GelMA) per il trattamento della perdita muscolare volumetrica (VML) (Russell, et al., 2020). La stampa e la reticolazione in situ del *bioink* hanno consentito una corretta adesione al tessuto nativo ed evitato la rottura dello *scaffold* dopo l'intervento chirurgico. Dopo 28 giorni dall'impianto, in situ, lo *scaffold* stampato, ha provocato una significativa ipertrofia del tessuto muscolare.

1.2 Applicazioni della stampa e della biostampa 3D nella medicina

La tecnologia del 3D printing è già stata utilizzata con successo per fabbricare impianti personalizzati, sistemi di somministrazione dei farmaci, strutture per l'ingegneria tissutale e modelli anatomici per la pianificazione chirurgica (Figura 7). Nell'ultimo decennio, la crescente domanda di dispositivi personalizzati, combinata con un'espansione dell'innovazione tecnologica, ha favorito il progresso della medicina personalizzata: dalla produzione di dosi di farmaci selezionate individualmente, alle protesi su misura per soddisfare le specifiche esigenze anatomiche dei pazienti.

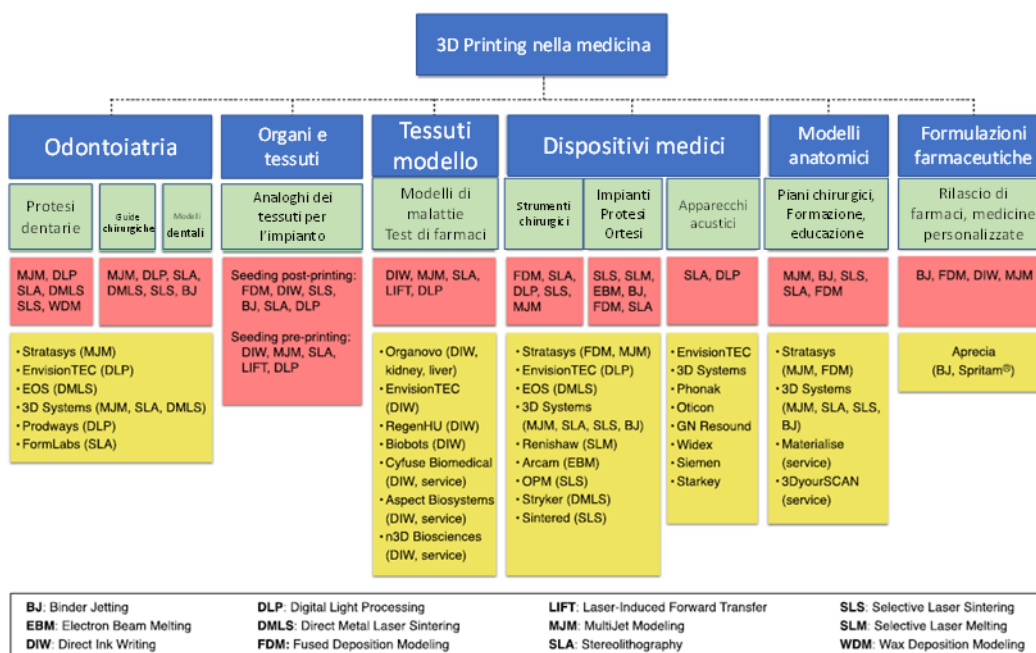


Figura 7. 3D printing nella medicina (Liaw, et al., 2017)

I nuovi obiettivi nella stampa 3D sono per lo più relativi alla formulazione di forme di dosaggio solide per la terapia personalizzata, il rilascio di farmaci transdermici e applicazioni biomedicali in cui sono inclusi impianti, modelli chirurgici, materiali biostampati e biorobotici.

1.2.1 Applicazione: Drug delivery

L'uso della stampa 3D nel campo del *drug delivery*, è cresciuto costantemente negli ultimi 30 anni. L'applicazione di queste tecnologie nel campo della somministrazione di farmaci è stata ampiamente studiata e più recentemente realizzata con l'approvazione dalla Food and Drug Administration (FDA) della compressa oro-disperdibile stampata in 3D, *Spritam* (levetiracetam) (Yu, et al., 2008; Moulton & Wallace, 2014).

I vantaggi dell'utilizzo di tecniche di produzione additiva per la progettazione di forme di dosaggio includono la capacità di controllare accuratamente la distribuzione spaziale di un ingrediente farmaceutico attivo (API) all'interno di una forma di dosaggio, produrre geometrie complesse, depositare quantità molto piccole di API, ridurre gli sprechi e consentire una rapida fabbricazione di composizioni variabili per consentire attività di screening o preparazione di dosaggi personalizzati (Katstra, et al., 2000; Rowe, et al., 2000). I vantaggi associati alla stampa di prodotti farmaceutici includono l'allontanamento dalle catene di approvvigionamento tradizionalmente complesse, lente e costose, la riduzione delle quantità e degli sprechi associati alla produzione di forme di dosaggio con contenuti standardizzati non idonei alle specifiche esigenze di ogni singolo paziente senza la necessità di una produzione in serie (Daly, et al., 2015).

Gli impianti e i dispositivi medici, come gli stent ed i cateteri, sono trattati con soluzioni o sospensioni attive per la somministrazione locale di farmaci, solitamente mediante tecniche di *coating* o *spray-coating* (Khan, et al., 2012); tuttavia, la stampa 3D offre una maggiore efficienza e un maggiore controllo nella deposizione e quindi nel caricamento del farmaco.

Tarcha e coll. hanno mostrato la capacità di depositare soluzioni farmacologiche su stent, utilizzando la tecnica di stampa a getto continuo (CJ) per un rivestimento a basso dosaggio, con elevata precisione e ripetibilità su varie configurazioni di stent e con una migliore efficienza di rivestimento rispetto ai metodi standard (Khan, et al., 2012). Gu e coll. hanno utilizzato una testina di stampa piezoelettrica per depositare *micropattern*

di rifampicina contenenti PLGA su un impianto ortopedico per prevenire l'adesione batterica sull'impianto (Gu, et al., 2012). Gupta e coll. hanno valutato la stampa di capsule caricate con farmaci su una superficie idrofobica che è stata ulteriormente funzionalizzata con un rivestimento polimerico contenente nanotubi d'oro (Gupta, et al., 2014).

In alternativa, i dispositivi per la somministrazione di farmaci possono essere fabbricati direttamente utilizzando tecniche di stampa 3D. Sandler e coll. sono stati in grado di incorporare l'agente antimicrobico, nitrofurantoina (NF) nel PLA per produrre filamenti mediante estrusione *hot melt* e successivamente utilizzare quei filamenti per alimentare una stampante 3D per fabbricare un dispositivo di rilascio di farmaci, come un catetere (Sandler, et al., 2014).

I sistemi di rilascio transdermico possono essere vantaggiosi per evitare il metabolismo di primo passaggio e/o la degradazione mediata dal pH o per consentire una facile somministrazione a pazienti con malattie croniche, come il diabete. Le tecniche di stampa 3D sono state anche utilizzate per la preparazione di cerotti transdermici multistrato; in particolare, la tecnologia 3D offre un vantaggio unico per la stampa di microaghi caricati con farmaci per la somministrazione transdermica. I microaghi sono generalmente lunghi meno di 500 μm e hanno lo scopo di penetrare nello strato corneo (10-15 μm) per rilasciare agenti attivi (Henry, et al., 1998). Questi aghi dovrebbero essere sufficientemente forti da penetrare nell'epidermide, ma non troppo da causare dolore o irritazione. I polimeri biodegradabili sono preferiti per la fabbricazione di questi aghi nel caso in cui una punta si stacchi e si intrappoli nella pelle. Le dimensioni, la forma e il numero di microaghi li rendono una geometria complessa da costruire e/o rivestire, ma ideale per le capacità delle tecnologie di stampa 3D. Boehm e coll. hanno utilizzato due processi di produzione additiva per preparare microaghi caricati con farmaci. La stereolitografia (SL) è stata utilizzata per preparare microaghi di poli (metil vinil etere-alt-anidride maleica), un polimero biodegradabile, e la stampa a getto d'inchiostro è stata utilizzata per rivestire gli aghi con quantum dot come agente attivo modello (Boehm, et al., 2011). Questi microaghi hanno dimostrato di avere una buona resistenza meccanica per la somministrazione transdermica.

1.2.2 Applicazione: Drug screening

Oltre all'applicazione nel *drug delivery* la stampa e soprattutto la biostampa 3D viene largamente utilizzata, come anticipato, in ingegneria tissutale per la realizzazione di

tessuti bioingegnerizzati che riproducono con elevata precisione la forma e, quindi, la funzione del tessuto nativo (Gungor-Ozkerim, et al., 2018; Sears, et al., 2016), ma anche per la creazione di modelli tumorali, specialmente per studi di *drug screening* (Sánchez-Salazar, et al., 2021). In particolare, in relazione a quest'ultimo aspetto, occorre sottolineare come la continua ricerca di nuovi farmaci e nuove tecniche terapeutiche per la cura del cancro necessiti della produzione di modelli *in vitro* che siano quanto più simili al tessuto neoplastico che si sviluppa *in vivo* nei tessuti dell'ospite (Breitenbach & Hoffmann, 2018; Sánchez-Salazar, et al., 2021). A causa della complessità e della presenza, oltre alle cellule tumorali, di altri citotipi (cellule staminali mesenchimali, cellule stromali, cellule endoteliali e cellule immunitarie), così anche di molecole di segnalazione (fattori di crescita, ormoni, peptidi, ecc...), sistema vascolare e matrice extracellulare (ECM) (Albritton & Miller, 2017; Langhans, 2018) in un tumore solido, i classici modelli di citotossicità preparati in 2D non sono spesso affidabili. Questi non riescono a riprodurre le caratteristiche morfologico-strutturali e la complessità citologica delle masse tumorali nella quali è spesso fortemente coinvolta la ECM (Gillet, et al., 2013) che influenza in modo significativo il fenotipo e il comportamento delle cellule (Albritton & Miller, 2017; Mouw, et al., 2014; Rozario & De Simone, 2010) e che nei tumori può anche determinare la risposta al trattamento antitumorale (Walker, et al., 2018). È, pertanto, necessaria una piena comprensione del microambiente tumorale per l'elaborazione di modelli per studi diagnostici e di *drug screening*.

Oltre ai già citati modelli 2D, sono frequentemente utilizzati anche modelli murini (o di altri animali in funzione del tumore da "riprodurre"), i quali conservano i vantaggi di essere completamente 3D e di avere la complessità di un tumore naturale, ma non sono rappresentativi al 100% della fisiologia del cancro umano (Johnson & Fleet, 2013) e il loro uso, oltre ad essere particolarmente costoso, genera anche questioni di carattere etico (Sánchez-Salazar, et al., 2021). Tali limiti portano alla necessità di sviluppare modelli 3D più rappresentativi che ricapitolino le caratteristiche morfologico-strutturali del tumore (Hoarau-Véchet, et al., 2018).

L'introduzione della biostampa 3D rappresenta la possibilità di produrre modelli tumorali complessi e vascolarizzati con una struttura più definita e personalizzata per lo screening dei farmaci antitumorali (Sánchez-Salazar, et al., 2021) utilizzando cellule tumorali derivate dallo specifico e singolo paziente. Le attuali piattaforme di coltura cellulare 3D possono essere classificate in tipi associati a *scaffold* (cellule incorporate

negli *scaffold*) e indipendenti dallo *scaffold* (sferoidi (Katt, et al., 2016) o organoidi (Fan, et al., 2019). Possono anche essere fabbricati in piattaforme specializzate, come lastre *micropatterned* e sistemi microfluidici (Katt, et al., 2016).

I modelli ottenuti con stampa 3D sono stati sviluppati in un'ampia varietà di strutture che vanno dalle fibre (Dai, et al., 2017), microperle (Kingsley, et al., 2019), dischi (Wang, et al., 2018c), griglie (Almela, et al., 2018), o multistrato (Wang, et al., 2018b), a strutture sandwich (Lee, et al., 2015), mini organi (Heinrich, et al., 2019a) e forme personalizzate (Campos, et al., 2019).

Il successo nella creazione *in vitro* di un modello tumorale 3D funzionale non può evincere dalla realizzazione di una microvascolatura all'interno del costruito stesso. Per raggiungere questo obiettivo sono stati sperimentati approcci differenti. E' stata sfruttata, ad esempio, la capacità delle cellule, di un determinato citotipo e in particolare quelle endoteliali, di orientarsi in maniera spontanea all'interno di una coltura mista, nell'organizzazione in strutture vascolari, oppure inoculando queste cellule all'interno di canalicoli lasciati vuoti durante la stampa, dove possono essere successivamente inoculate cellule endoteliali (Sánchez-Salazar, et al., 2021).

Ad oggi, i diversi tentativi di biostampa per meglio mimare il microambiente tumorale si sono basati nel mimare le caratteristiche dell'ECM, che rappresenta uno dei fattori strutturali chiave nell'organizzazione dei tessuti tumorali e nel *cell signaling* (Kang, et al., 2020). Ad esempio, Kreimendahl e coll. hanno biostampato miscele di idrogel a base di collagene di tipo I-agarosio e di fibrinogeno-agarosio con elevata stabilità meccanica, contenenti cellule endoteliali della vena ombelicale umana e con capacità di vascolarizzazione indotta da fibroblasti dermici umani (Kreimendahl & Ko, 2017). Ren e coll. hanno utilizzato un idrogel di collagene di tipo II con un gradiente di densità di condrociti per mimare la matrice extracellulare cartilaginea e le diverse funzioni che svolgono i vari strati cartilaginei con particolare attenzione al ruolo nella distribuzione zonale della ECM (Ren et al., 2016).

1.2.3 Applicazione: Tissue engineering

Per quanto riguarda le applicazioni in ingegneria tissutale la biostampa 3D permette di ottenere un controllo più fine, sia sulle caratteristiche morfologico-strutturali che sulla disposizione cellulare, dei tessuti bioingegnerizzati (Rider, et al., 2018) grazie alle rappresentazioni digitali di parti anatomiche danneggiate ottenute mediante risonanza magnetica (MRI) o tomografia computerizzata (TC); questi dati ottenuti vengono

elaborati digitalmente in maniera tale da ottenere dei modelli convertiti in file STL (tassellation language standard) per la produzione di *scaffolds* impiantabili contenenti cellule (Murphy & Atala, 2014).

La medicina, per molto tempo, ha dovuto affrontare sfide complesse per ovviare al problema della riparazione o sostituzione di parti del corpo umano danneggiate in seguito a traumi o malattie.

Nonostante gli sviluppi della medicina moderna in campo biomedico, a causa della complessità ed alta organizzazione istologica dei tessuti, ad oggi questa sfida è ancora più che attuale. Il trapianto di organi è infatti limitato alla disponibilità di donatori e ai ben conosciuti problemi di compatibilità che spesso sfociano nel rigetto di organo. Tradizionalmente, oltre alla terapia farmacologica, l'autotrapianto e l'omoinnesto sono i metodi preferiti per la sostituzione di tessuti e organi compromessi. A causa di tutte le problematiche ad essi associate, è fortemente auspicabile un'ulteriore esplorazione delle tecnologie e delle strategie per soddisfare la domanda di rigenerazione dei tessuti e trapianto. La ricerca di organi artificiali in grado di sostituire non solo fisicamente ma anche funzionalmente una parte del corpo è rallentata dalle severe complicazioni che si incontrano nel mimare la complessa architettura del tessuto nativo sia in termini di forma che di interazioni cellulari e di risposte biologiche e fisiologiche. A causa di queste complicazioni si è spesso fatto ricorso a semplificazioni grossalane dando vita a protesi rudimentali che non erano in grado di riprodurre completamente la complessità delle funzioni fisiologiche.

In questo panorama, la nascita dell'ingegneria tissutale (tissue engineering, TE), con l'obiettivo di aumentare la conoscenza di come le cellule interagiscono su nano scala e meglio comprendere i meccanismi intrinseci dei tessuti e degli organi danneggiati, si propone sia la sostituzione di questi quanto la rigenerazione degli stessi grazie alla progettazione di tessuti biomimetici in grado di meglio emulare le funzioni fisiologiche. Ovviamente questa rivoluzione il campo biomedico (Dzobo, et al., 2018) richiede un approccio multidisciplinare che pone le sue fondamenta sulla produzione di costrutti impiantabili, di cellule e sistemi che permettano la produzione di segnali biologici e garantiscano la ricostruzione, il ripristino e/o la riparazione funzionale e strutturale dei tessuti danneggiati (O'Brien, 2011).

In particolare, combinando i principi della biologia cellulare e dell'ingegneria è possibile sviluppare tessuti bioingegnerizzati in grado di sostituire la porzione lesa, incapace di auto ripararsi, da un punto di vista funzionale e di integrarsi con il tessuto

ospite, consentendo così strategie terapeutiche efficaci volte alla riparazione e al ripristino della funzione dei tessuti (Langer & Vacanti, 1993; O'Brien, 2011; Vacanti & Langer, 1999)

Per far tutto questo, l'ingegneria tissutale si basa, come già anticipato, sulla produzione di tessuti bioingegnerizzati, ovvero tessuti artificiali costituiti da *scaffold* impiantabili, cellule autologhe (staminali e/o differenziate) e molecole bioattive, come fattori di crescita e/o farmaci (O'Brien, 2011).

Lo *scaffold* rappresenta l'entità fondamentale per il successo della TE, e le sue proprietà morfologiche, strutturali, biologiche, fisiche e chimiche influenzano notevolmente la rigenerazione, la vitalità e la funzionalità dei tessuti *in vitro* e *in vivo* costituendo il fattore critico nell'ingegneria tissutale. Pertanto deve avere strutture tridimensionali porose per favorire la motilità delle cellule, supportare l'interazione cellula-cellula, garantire la corretta produzione di segnali biologici utili alla crescita e alla riparazione cellulare, nonché il corretto funzionamento delle cellule, la diffusione di sostanze nutritive e dei prodotti di scarto del metabolismo cellulare (Carletti, et al., 2011; Ramesh, et al., 2021; Dhandayuthapani, et al., 2011; Tamayol, et al., 2013). Deve, inoltre, essere meccanicamente e geometricamente simile al tessuto nativo e aiutare nella formazione della matrice extracellulare (Elkhoury, et al., 2019; Ramesh, et al., 2018) (ECM).

Gli *scaffold* e, quindi, i biomateriali che li costituiscono, devono essere biocompatibili, non immunogeni e biodegradabili. I tessuti bioingegnerizzati non sono intesi come impianti permanenti; lo *scaffold* deve, infatti, degradarsi lentamente nell'ambiente fisiologico consentendo allo stesso tempo alle cellule di produrre la propria matrice extracellulare e i sottoprodotti di questa degradazione devono, inoltre, essere atossici ed essere eliminati dal corpo senza interferenze con altri organi (O'Brien, 2011).

Oltre alla possibilità di incorporare le cellule, occorre sottolineare come lo *scaffold* possa incorporare anche molecole bioattive come fattori di crescita in grado di stimolare la proliferazione sia delle cellule impiantate che di quelle dei tessuti circostanti, in seguito all'impianto, o molecole in grado di richiamare cellule staminali dai tessuti limitrofi, al fine di favorire la rigenerazione del tessuto danneggiato; o ancora modulatori della risposta infiammatoria e immunitaria, al fine di ridurre il danno al tessuto in questione e favorirne, in tal modo, la guarigione (Siemann, 2005). Ad oggi, sono diverse le tecniche usate nell'ingegneria tissutale per generare tessuti bioingegnerizzati (Bajaj, et al., 2014). È chiaro che l'obiettivo di questi metodi di

biofabbricazione è la realizzazione di costrutti capaci di mimare l'architettura tissutale o, eventualmente, di adattarsi con precisione ad un difetto del tessuto (Temple, et al., 2014). In particolare i tessuti bioingegnerizzati, per essere ottimali, devono essere quanto più simili ai tessuti nativi, mimarne le caratteristiche morfologiche, strutturali, la natura chimico-fisica e anche la componente cellulare sia in termini di presenza di vari citotipi che di loro organizzazione spaziale (Ungaro, et al., 2005).

I processi tradizionali di fabbricazione di *scaffolds* spesso non permettono di raggiungere questi requisiti a causa della modalità di caricamento delle cellule che avviene seminando le cellule sullo *scaffold* preformato (Bajaj, et al., 2014). L'incapacità di ottenere *scaffold* cellularizzati a causa dei processi di produzione che minerebbero la vitalità delle cellule, genera *scaffold* disomogenei che non riescono a riprodurre la complessità del tessuto nativo (Oberpenning, et al., 1999). Inoltre queste tecniche, il più delle volte, non sono in grado di realizzare strutture 3D ben definite (Tsang & Bhatia, 2007).

Per far fronte a questo problema, l'ingegneria tissutale, negli ultimi decenni, ha ricorso alla stampa 3D, che in campo biomedico prende il nome di biostampa, tecnica che consente la deposizione tridimensionale e la stratificazione sequenziale di cellule e biomateriali, conosciuti anche come *bioinks* (Dababneh & Ozbolat, 2014; Murphy & Atala, 2014).

Molti tessuti hanno, difatti, una complessità strutturale e, soprattutto, cellulare che le tecniche tradizionali non riescono a riproporre (Sears, et al., 2016).

Sotto questo aspetto, la biostampa tridimensionale (3D), invece, riesce a creare tessuti bioingegnerizzati con un elevato grado di analogia con i tessuti nativi, non solo al controllo della forma ma anche alla possibilità di incapsulare le cellule prima della produzione dello *scaffold* permettendo di ottenere un costrutto 3D dove le cellule sono distribuite omogeneamente (Zhang, et al., 2017). La biostampa consente, dunque, di colmare le divergenze esistenti tra i costrutti artificiali e i tessuti nativi, garantendo un controllo preciso sulle distribuzioni spaziali delle cellule e dei biomateriali utilizzati (Zhang, et al., 2016). Di conseguenza, è possibile ottenere costrutti ingegnerizzati che imitano accuratamente la forma, la struttura, l'architettura, nonché la funzione di specifici tessuti e organi (Murphy & Atala, 2014; Malda, et al., 2013). Questo, certamente, ha portato la biostampa 3D ad occupare un posto di rilievo tra tutti gli altri metodi per la produzione di *scaffold* tissutali in quanto capace di colmare la differenza

tra costrutti di tessuto ingegnerizzati artificialmente e tessuti nativi (Moradi, et al., 2020; Unagolla & Jayasuriya, 2020).

Inoltre, la possibilità di utilizzare diversi tipi cellulari e di controllarne molto più accuratamente la distribuzione spaziale in un dato tessuto (Zhang, et al., 2017), unitamente alla possibilità di ottenere tessuti bioingegnerizzati contenenti una o più linee cellulari orientate in maniera altamente specifica, permette di mimare i tessuti nativi in maniera più efficace rispetto alle classiche tecniche di produzione di *scaffold*.

1.3 Bioink e biomaterial ink

Componente essenziale nelle tecniche di biostampa 3D è il *bioink*. In letteratura, i *bioinks*, o bioinchiostri, sono definiti come “una formulazione di cellule adatta al trattamento con una tecnologia automatizzata di biofabbricazione che può contenere biomateriali e componenti biologicamente attivi” (Groll, et al., 2019).

Tuttavia, spesso, assieme alle cellule si utilizzano anche altri componenti, quali biomateriali, matrici decellularizzate, microcarrier cellulari, sferoidi cellulari/tissutali, organoidi e/o molecole bioattive, ad esempio peptidi adesivi (RGD, KRSR, ecc.), fattori di crescita (VEGF, TGF- β , ecc.), proteine (BMP-2, ecc.), citochine (IL-4, ecc.), miRNA e DNA (Li, et al., 2020a; Kaigler, et al., 2013).

I *bioinks* sono gli elementi costitutivi di base per la fabbricazione di costrutti 3D biostampati, svolgono un ruolo chiave nel supporto strutturale, nell'adesione e nella differenziazione delle cellule incorporate. A causa della diversità dei tipi di tessuto e della necessità di emulare molte delle caratteristiche strutturali e funzionali di un tessuto bersaglio, ci sono molti potenziali *bioinks*, ma relativamente pochi al momento possiedono proprietà ottimali. In particolare, esistono due tipologie principali di *bioinks* (Ozbolat, 2015b). Il primo tipo di *bioinks* comprende idrogeli, componenti di matrice decellularizzata e microcarrier e rappresenta la tipologia più comune. Questo *bioink* “basato su *scaffold*” consiste in matrici tridimensionali idratate, in cui vengono caricate le cellule, assimilabili a idrogel polimerici che mimano l'ECM nativa. Nella seconda tipologia di *bioinks*, che comprende sferoidi tissutali, pellet cellulari e filamenti di tessuto (Hospodiuk, et al., 2017) le cellule vengono biostampate senza l'uso di un biomateriale esogeno, in un processo privo di *scaffold* che imita lo sviluppo embrionale. Nello specifico, le cellule vengono prima utilizzate per la formazione di aggregati multicellulari, che imitano i tessuti embrionali e rappresentano le unità costitutive per la successiva creazione di tessuti funzionali su larga scala; questi

aggregati cellulari andranno, poi, a costituire il *bioink* che verrà depositato in stampi specifici, dove instaureranno delle reciproche interazioni per dare vita a tessuti funzionali di dimensioni maggiori.

Le caratteristiche fisiche, meccaniche e biologiche devono essere tutte prese in considerazione nella progettazione e composizione dei *bioinks*. La topografia dello scaffold ed il caricamento di fattori di crescita e morfogeni sono necessari per controllare il destino delle cellule.

Le proprietà meccaniche, la stampabilità (cioè la capacità di essere processato con tecniche di stampa 3D), la biocompatibilità e una biodegradabilità controllata dovranno essere adeguate alle esigenze di specifici organi e tessuti. Pertanto il bioinchiostro deve essere opportunamente selezionato, ed eventualmente modificato, per essere in grado di rigenerare una particolare struttura tissutale (Gopinathan & Noh, 2017).

I *bioinks* sono dunque una classe distinta di biomateriali, che devono mantenere la forma una volta stampata sfruttando ad esempio la gelificazione termica o la reticolazione chimica.

Quindi, per quanto riguarda la scelta dei materiali è necessario considerare numerosi parametri, tra i quali le proprietà reologiche, i meccanismi di polimerizzazione, la citotossicità e la compatibilità del materiale con la stampante che verrà utilizzata (Lee & Dai, 2016). Lo scopo è quello di garantire la formazione di strutture tissutali aventi adeguata resistenza meccanica; una gelificazione in qualche modo regolabile per ottenere strutture capaci di mantenere la forma e di riprodurre al meglio il modello digitale; la biocompatibilità e, se necessario, la biodegradabilità; infine, una potenziale produzione su larga scala con elevata riproducibilità (Loo, et al., 2015).

Inoltre, la formulazione del *bioink* richiede un compromesso tra la stampabilità, quindi l' idoneità alla fabbricazione, e la capacità di incapsulare le cellule mantenendo la loro vitalità. Questo concetto viene definito finestra di biofabbricazione (*biofabrication window*) e consente la realizzazione di complessi costrutti ad alta fedeltà di forma e risoluzione (Figura 8) (Malda, et al., 2013; Chimene, et al., 2016).

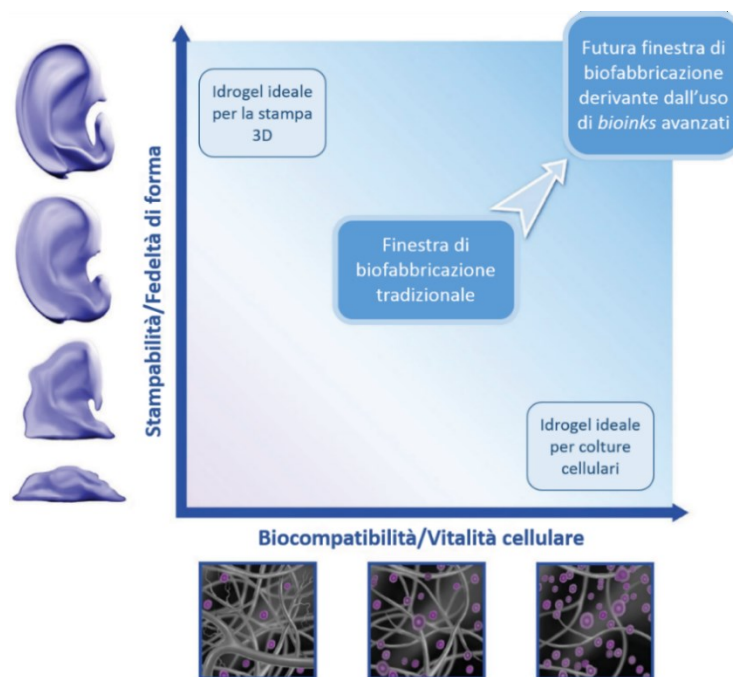


Figura 8. Finestra di biofabbricazione (Kyle, et al., 2017)

I materiali idonei alla stampa spesso possiedono un'elevata viscosità rispetto ai tradizionali materiali, quali gli idrogeli. La viscosità gioca un ruolo fondamentale nelle caratteristiche del sistema: ad esempio, i *bioink* ad alta viscosità sono prontamente estrusi e possono mantenere la forma dopo l'estrusione (Momen-Heravi, et al., 2012), tuttavia, richiedono elevate forze di deformazione durante l'estrusione che possono danneggiare le cellule incapsulate; mentre i *bioinks* a bassa viscosità possono ridurre al minimo l'intasamento degli ugelli e consentire la miscelazione delle cellule, ma non sono in grado una volta depositati di mantenere la forma data dalla stampa.

Gli idrogeli sono ben noti come formulazioni appropriate per lo sviluppo di *scaffold* a motivo della possibilità di mimare l'ECM, in termini di composizione e struttura, e per la facilità di formulazione utilizzando metodiche di preparazione che non necessitano di processi particolarmente complessi (Askari, et al., 2021). Il loro largo impiego è da attribuire alla loro capacità di mantenere una struttura 3D porosa, di fornire supporto meccanico alle cellule e nel contempo di trattenere al loro interno un elevato contenuto di acqua, consentendo la possibilità di incapsulare elevate densità cellulari e di mantenere una distribuzione cellulare, omogenea in tutto lo *scaffold* (Chen, 2018a; Chung, et al., 2013). Queste proprietà ne consentono l'utilizzo nella creazione di *scaffold* per l'ingegneria tissutale e nella formulazione di *bioink* per la biostampa 3D (Figura 9) e, soprattutto, per la tecnica ad estrusione (Athukoralalage, et al., 2019).

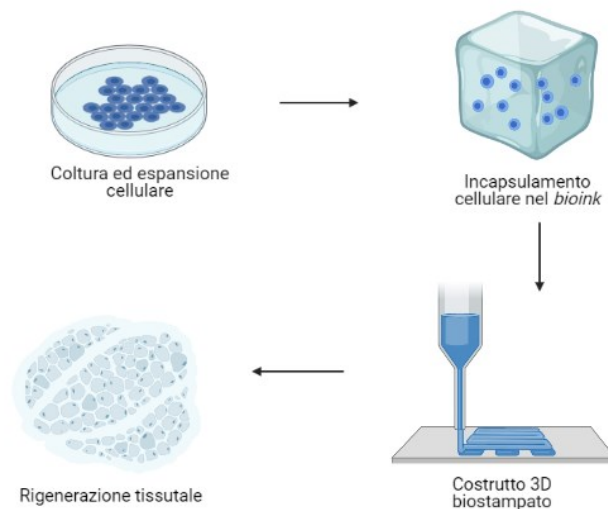


Figura 9. Schematizzazione del processo di biostampa, dalla coltura cellulare in vitro fino alla rigenerazione tissutale in vivo

Da un punto di vista tecnologico, un idrogelo è un semisolido in cui la fase dispersa forma un reticolo tridimensionale che incorpora la fase disperdente, generalmente acquosa. Gli idrogeli possono essere costituiti a partire da polimeri naturali, sintetici o semisintetici o possono anche essere prodotti a partire da miscele ibride di macromolecole di origine naturale e sintetica (Zorlutuna, et al., 2013). In campo biomedico, vari biomateriali polimerici naturali e sintetici sono stati studiati e impiegati come materiali per *scaffolds* per applicazioni in TE e in medicina rigenerativa (Khan & Tanaka, 2018). I polimeri naturali più importanti per questo scopo sono macromolecole a struttura polipeptidica e polisaccaridica come chitosano, collagene, alginato, amido, cellulosa, gelatina, fibrina, fibroina della seta, gomma gellano e acido ialuronico (Khan & Tanaka, 2018; Rahmani Del Bakhshayesh, et al., 2018; Zia, et al., 2015). I biomateriali sintetici includono, acido polilattico (PLA), acido polilattico-co-glicolico (PLGA), policaprolattone, polietilenglicole (PEG), alcol polivinilico (PVA) e poliuretani (PU) (Grasman, et al., 2015; Janik & Marzec, 2015; Khan & Tanaka, 2018).

I polimeri naturali, inclusi i polisaccaridi e le proteine, sono frequentemente utilizzati grazie alla loro biocompatibilità, tossicità minima e bassi costi (Cooke & Rosenzweig, 2021). Tuttavia, le loro proprietà meccaniche non sempre corrispondono al tessuto nativo e la loro biodegradabilità può essere imprevedibile. D'altra parte, i polimeri sintetici possono offrire versatilità nelle loro proprietà fisiche e meccaniche, più

definite e ripetibili grazie al fatto che si possono controllare finemente le condizioni di reazione durante i processi produttivi. Per tali ragioni alcuni ricercatori hanno utilizzato una combinazione di polimeri naturali e sintetici per trarre i vantaggi di ciascuno e per far fronte alle limitazioni che entrambi presentano (Schuurman, et al., 2011; Xu, et al., 2013).

Tra i polisaccaridi, la gomma gellano e l'acido ialuronico meritano attenzione; entrambi questi polimeri possono essere modificati grazie alla presenza di gruppi funzionali, per ottenere nuovi derivati con appropriate caratteristiche.

1.3.1 Gomma gellano

Negli ultimi anni la gomma gellano (GG) grazie alla sua biocompatibilità e bassa citotossicità (Osmałek, et al., 2014) ha acquisito un'importanza crescente in ambito biomedico per l'utilizzo come biomateriale di partenza per la produzione di dispositivi biomedicali avanzati come, ad esempio, idrogeli per il *drug delivery* e l'ingegneria tissutale (Oliveira, et al., 2010a; Silva-Correia, et al., 2011). Recenti studi hanno dimostrato che diversi tipi di cellule incapsulate negli idrogeli di GG mantengono un'elevata vitalità e funzionalità adeguata, questo è fondamentale per le applicazioni in ingegneria tissutale (Smith, et al., 2007) e in medicina rigenerativa. Caratteristiche vantaggiose per l'uso della GG in TE sono la mancanza di tossicità, la biocompatibilità, le condizioni blande adoperate per la lavorazione, la rapida gelificazione in presenza di cationi, l'elevato contenuto di acqua, la possibilità di utilizzarla come sistema iniettabile in modo minimamente invasivo, la somiglianza strutturale con i glicosaminoglicani nativi (per via della presenza di residui di acido glucuronico nell'unità ripetitiva) e la somiglianza meccanica con i moduli elastici dei tessuti presenti nell'organismo (Bacelar, et al., 2016; Ruoslahti, 1989; Jen, et al., 1996).

In questo filone di ricerca si innesta l'idea di utilizzare la gomma gellano per la produzione di *bioinks*.

La gomma gellano è un esopolisaccaride prodotto da batteri del gruppo *Sphingomonas* come costituente principale della loro sostanza polimerica extracellulare (EPS) (Stevens, et al., 2016). Si presenta come un solido dal colore biancastro, e dopo l'approvazione come additivo alimentare dalla United States Food and Drug Administration (FDA) e dall'Unione Europea (E418), è stato ampiamente utilizzato nelle industrie farmaceutiche e alimentari come agente gelificante e stabilizzante

(Wuestenberg, 2014; Gibson & Sanderson, 1997; Chandrasekaran & Radha, 1995). La gomma gellano è un polisaccaride anionico lineare ad alto peso molecolare (BeMiller, 1996) costituito da un'unità ripetitiva tetramerica che si ripete composta da glucosio, acido glucuronico, glucosio e ramnosio secondo la seguente struttura: $[\text{D-Glc}(\beta 1 \rightarrow 4) \text{D-GlcA}(\beta 1 \rightarrow 4) \text{D-Glc}(\beta 1 \rightarrow 4) \text{L-Rha}(\alpha 1 \rightarrow 3)]_n$ (Jansson, et al., 1983) La forma nativa presenta un sostituito L-glicerile sul terzo carbonio del residuo D-Glc e, in alcune unità ripetitive, un certo grado di acetilazione sul carbonio anomero dello stesso residuo, che è molto variabile da lotto a lotto di produzione (Kuo, et al., 1986); in media si ha un glicerato per ogni ripetizione e un acetato ogni due ripetizioni dell'unità tetrasaccaridica. Per questo motivo è possibile distinguere due forme diverse di GG, a seconda del grado di acilazione: la forma acetilata, solitamente denominata gomma gellano ad alto contenuto di acile (HAGG, *high acyl gellan gum*) (Osmalek, et al., 2014), e la gomma gellano a basso contenuto di acile (LAGG, *low acyl gellan gum*). Quest'ultima, ottenuta in seguito ad un trattamento termico con alcali, (Nitta, et al., 2010; Bacelar, et al., 2016; Oliveira, et al., 2010a), non presenta gruppi acilici ed è la forma più comune e la più disponibile in commercio (Figura 10) (Palumbo, et al., 2020).

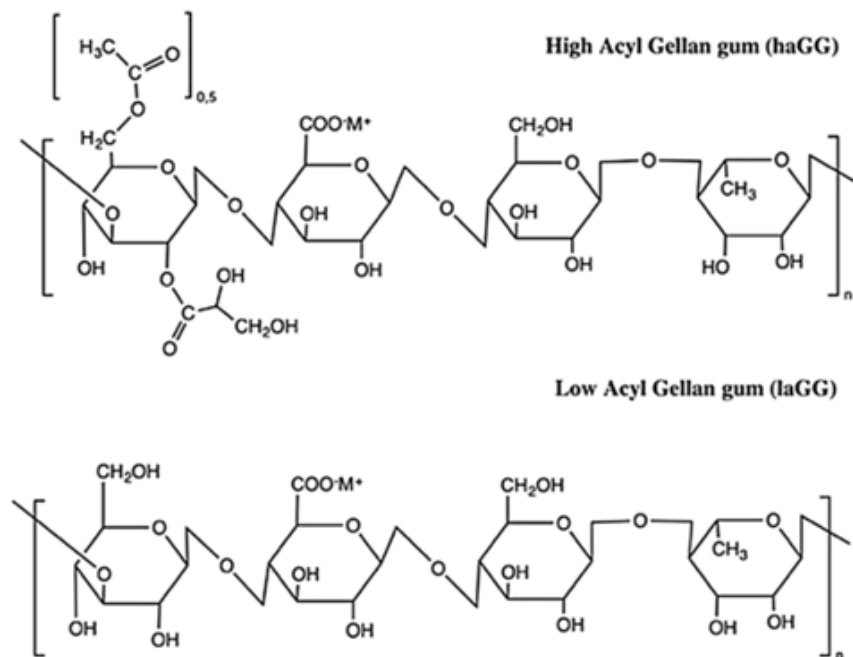


Figura 10. Struttura chimica della gomma gellano nativa (haGG) e della gomma gellano a basso contenuto di acile (laGG) (Palumbo, et al., 2020)

Variando le concentrazioni ed il rapporto delle due forme di GG, è possibile ottenere gel aventi diversa consistenza, diverso contenuto d'acqua e diverso profilo di degradazione (Mao, et al., 2000; Mao, et al., 2001).

La gomma gellano forma idrogeli fisici mediante un processo reversibile indotto da variazioni di temperatura e dalla presenza di cationi. In particolare, dopo aver ottenuto una dispersione acquosa omogenea, la gelificazione si verifica a seguito di un abbassamento della temperatura che provoca una variazione conformazionale delle catene polimeriche: da una forma a spirale (*random coil*) ad alta temperatura (circa 90°C per una soluzione all'1% di GG), ad una struttura a doppia elica dopo il raffreddamento. Questo processo è noto come *coil-helix transition* (Figura 11) (Agnello, et al., 2018).

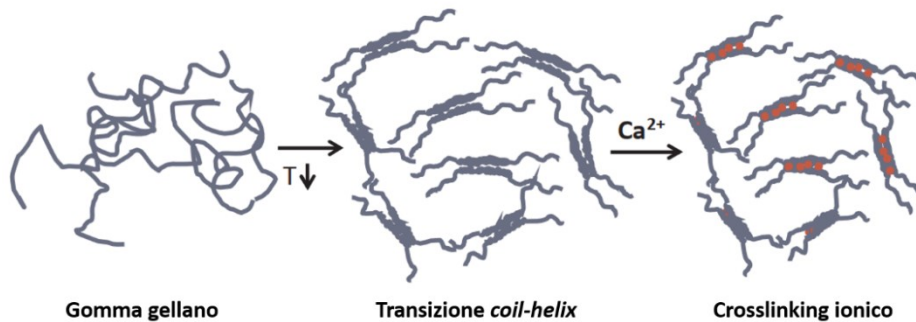


Figura 11. Rappresentazione schematica della transizione *coil-helix* e del *crosslinking ionico* della gomma gellano (Agnello, et al., 2018)

Al diminuire della temperatura, dunque, si verifica una modifica nella disposizione delle catene che si traduce nel passaggio da uno stato disordinato (catene singole) ad uno più ordinato e altamente organizzato (doppia elica) (Bacelar, et al., 2016; Miyoshi, et al., 1996; Morris, et al., 2012; Milas, et al., 1990; Ogawa, 1997) (Figura 12) (Palumbo, et al., 2020).

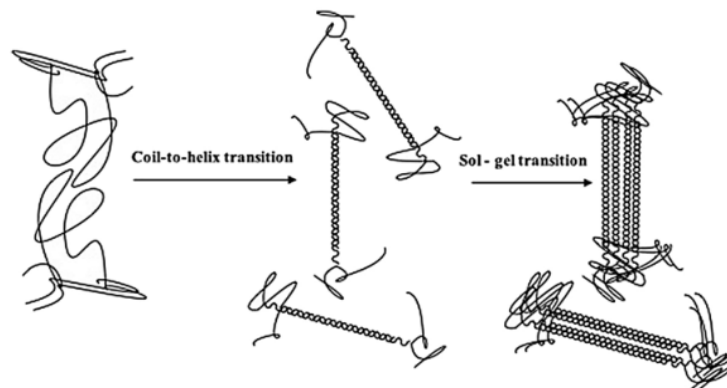


Figura 12. Transizione "Coil-to-helix" e "sol-gel" della gomma gellano (Palumbo, et al., 2020)

La gelificazione è dovuta, infine, all'aggregazione delle doppie eliche in punti di giunzione, si forma così un *network* tridimensionale (Quinn, et al., 1993). Gunning e Morris furono i primi ad analizzare questa struttura tramite tecniche di *light-scattering* (Gunning & Morris, 1990), in un secondo momento è stata osservata direttamente con la microscopia a forza atomica (Gunning, et al., 1996; Noda, et al., 2008).

Il grado di acetilazione della gomma gellano influenza fortemente la gelificazione, nonché le proprietà reologiche delle dispersioni acquose e degli idrogeli risultanti (Jay, et al., 1998). I geli presentano, infatti, diverse proprietà meccaniche a seconda del grado di acetilazione della GG: la forma acetilata produce gel morbidi ed elastici, mentre la forma deacetilata produce gel duri, rigidi e fragili (Figura 13) (Bacelar, et al., 2016; Grasdalen & Smidsrød, 1987; Morris, et al., 1996).

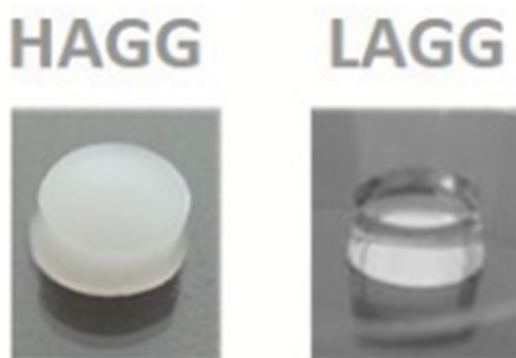


Figura 13. Foto degli idrogeli di HAGG e LAGG 2% (p/v) (Bacelar, et al., 2016)

L'elevata velocità di gelificazione riduce la forza e l'elasticità dei gel risultanti a causa di una ridotta reticolazione tra le eliche che non possono formare una struttura ordinata (Palumbo, et al., 2020).

La gomma gellano può subire un processo di gelificazione ionotropica in presenza di cationi (Oliveira, et al., 2010a; Crescenzi, et al., 1990; Ogawa, et al., 2006). Infatti, la transizione *coil-helix* porta ad una parziale aggregazione delle eliche con la conseguente formazione di una struttura ordinata, ma poco stabile (Miyoshi, et al., 1996). Questo è dovuto principalmente alla repulsione elettrostatica data dalla presenza dei gruppi carbossilici laterali, ostacolando così il legame delle eliche e la loro aggregazione (Milas, et al., 1990; Grasdalen & Smidsrød, 1987; Crescenzi, et al., 1986). Questi stessi gruppi carbossilici possono, tuttavia, contribuire positivamente al processo di gelificazione mediante interazione ionica con numerosi cationi, determinando un rafforzamento dell'architettura dell'idrogel (Palumbo, et al., 2020).

La presenza dei cationi, dunque, permette di schermare la repulsione elettrostatica e consentire una più stretta aggregazione delle catene elicoidali (Miyoshi, et al., 1996; Morris, et al., 1980; Nakajima, et al., 1996). In particolare, sia la quantità che la natura chimica dei cationi presenti in soluzione influiscono sul processo di gelificazione della GG: i cationi bivalenti (ad esempio, Ca^{2+} e Mg^{2+}) favoriscono una gelificazione più efficiente rispetto a quelli monovalenti (ad esempio, Na^+ e K^+) (Quinn, et al., 1993; Ogawa, et al., 2002). Infatti, questi ultimi inducono semplicemente l'aggregazione delle catene schermando la repulsione elettrostatica tra i gruppi carbossilici ionizzati delle diverse eliche, mentre i cationi bivalenti instaurano dei legami di coordinazione con due gruppi carbossilati spazialmente vicini, inducendo *cross-linking* ionotropico (Bacelar, et al., 2016; Morris, et al., 2012; Kang, et al., 2015; Singh & Kim, 2005).

La sensibilità della gomma gellano alla presenza di cationi ne ha incoraggiato notevolmente l'uso in formulazioni dove possono essere necessarie condizioni poco drastiche per incorporare farmaci o cellule (Palumbo, et al., 2020). Tuttavia, un inconveniente degli idrogeli di gomma gellano reticolati ionotropicamente è la scarsa stabilità meccanica *in vivo*, in quanto si dissolvono gradualmente a causa dello scambio dei cationi bivalenti con quelli monovalenti presenti nei fluidi fisiologici (Bacelar, et al., 2016; LeRoux, et al., 1999; Oliveira, et al., 2009) con conseguente indebolimento dell'architettura del gel (Stevens, et al., 2016). Inoltre, in presenza di ioni, dal momento che si instaura un maggior numero di interazioni tra le diverse eliche, è necessario raggiungere temperature molto più alte per passare allo stato di *sol*, e, allo stesso tempo, la transizione *coil-to-helix* avverrà a temperature maggiori a motivo di un più alto numero di zone di legame tra le catene di gomma gellano. Pertanto, la presenza di ioni influenza la gelificazione termoreversibile di questo polimero, facendo sì che le temperature di gelificazione e fluidificazione degli idrogeli subiscano uno spostamento verso valori più elevati.

La transizione *coil-to-helix* dipende quindi da diverse variabili, e tra queste anche il peso molecolare ha un effetto sul processo di gelificazione. Ogawa e coll. hanno dimostrato che l'aumento del peso molecolare accelera la suddetta transizione, rendendo più rapido il processo di gelificazione (Ogawa, et al., 2006).

La natura anionica della gomma gellano dovuta alla presenza dei gruppi carbossilici rende questo polisaccaride dipendente dal pH del mezzo. Nello specifico, in ambiente acido, si ha la protonazione dei gruppi carbossilici, con notevole riduzione della repulsione elettrostatica tra questi gruppi e conseguente maggiore strutturazione dei

relativi idrogeli (Horinaka, et al., 2004). Inoltre, lo ione H^+ , come un qualsiasi catione monovalente, esercita un effetto schermante sulla repulsione elettrostatica tra i gruppi carbossilici ionizzati inducendo una maggiore aggregazione delle diverse eliche e aumentando anche la T_m .

E' stato anche riscontrato che la gomma gellano ha una bassa capacità di indurre infiammazione *in vivo*, motivo per cui formulazioni contenenti questo polisaccaride sono state valutate per potenziali applicazioni terapeutiche, come, ad esempio, per ridurre le aderenze post-chirurgiche e per la rigenerazione del nucleo polposo nei dischi intervertebrali (Silva-Correia, et al., 2012).

La gomma gellano presenta, dunque, rispetto agli altri polisaccaridi, dei vantaggi notevoli che ne hanno determinato un utilizzo molto ampio in ingegneria tissutale. In particolare, presenta una notevole resistenza alle alte temperature e una gelificazione ionotropica e, anche, dipendente dalla temperatura.

La temperatura di gelificazione, tuttavia, è incompatibile con la maggior parte delle strategie di incapsulamento cellulare, dal momento che sono richieste condizioni vicine a quelle fisiologiche in quanto, anche a basse concentrazioni, le dispersioni acquose di gomma gellano risultano essere molto viscosi a temperatura ambiente e non possono essere miscelate efficacemente con le dispersioni cellulari. Negli ultimi dieci anni sono stati condotti molti studi per valutare come ridurre la temperatura di gelificazione e migliorare la stabilità della gomma gellano nativa. La modulazione della temperatura di gelificazione tramite il controllo di parametri come concentrazione e peso molecolare, concentrazione e carica dei cationi presenti in soluzione e pH ha permesso il suo uso in campo biomedico.

Una delle principali strategie consiste nella riduzione del peso molecolare della gomma gellano tramite ultra-sonicazione (D'Arrigo, et al., 2012), tramite ossidazione con periodato di sodio ($NaIO_4$) (Gong, et al., 2009) o mediante degradazione in ambiente fortemente basico (Agnello, et al., 2018; Nitta, et al., 2010); in tutti i casi si è verificato un decremento appropriato della temperatura di gelificazione, che ha consentito una migliore processabilità di questo polimero. Anche la carbossimetilazione (Miyamoto, et al., 1996; Novac, et al., 2013) e la tiolazione (Krauland, et al., 2003; Du, et al., 2012) del gellano migliorano le proprietà gelificanti *in situ* della GG.

Inoltre, è stato visto che molti tipi di cellule, essendo dipendenti dall'ancoraggio, non riescono ad aderire né a diffondere quando si trovano a contatto con gli idrogeli di GG,

questo è dovuto alla mancanza di siti di adesione nella struttura (Bacelar, et al., 2016; Silva-Correia, et al., 2016).

La mancanza di affinità delle cellule dipendenti dall'ancoraggio è stata attribuita all'estrema natura idrofila e alla carica negativa del polimero che respinge le cellule (Bacelar, et al., 2016). Per consentire l'adesione delle cellule, una strategia molto valida prevede la combinazione della GG con sequenze di proteine (ad esempio gelatina (Wang, et al., 2008a) e peptidi a corta catena (RGD) (D'Souza, et al., 1991) (Ferris, et al., 2015; Silva, et al., 2012). Il legame covalente con RGD migliorava l'adesione e la proliferazione cellulare all'interno degli idrogeli modificati (Figura 14) (Bacelar, et al., 2016) con un impatto significativo e positivo sulle cellule incapsulate (Stevens, et al., 2016).

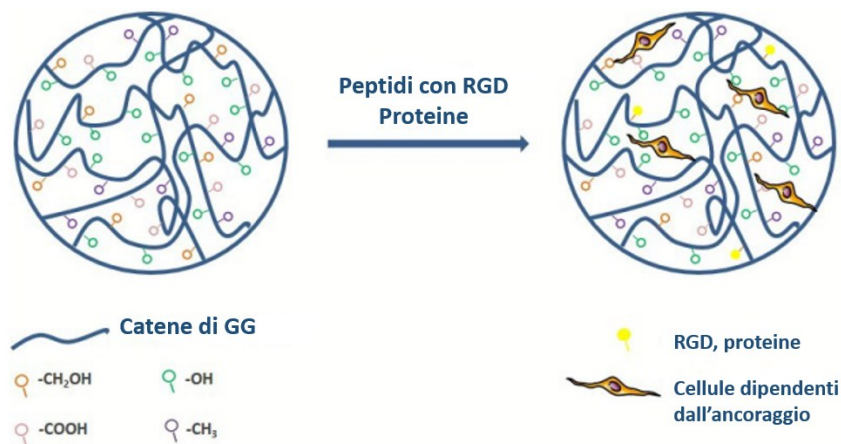


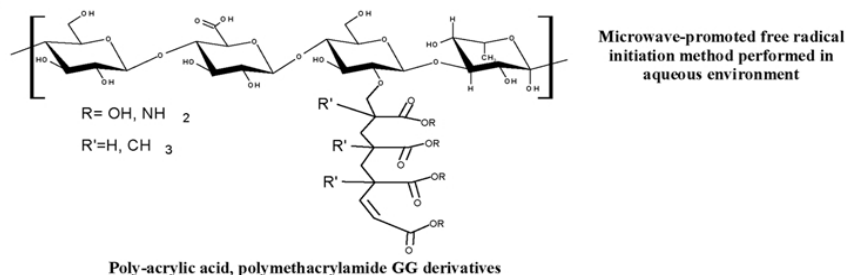
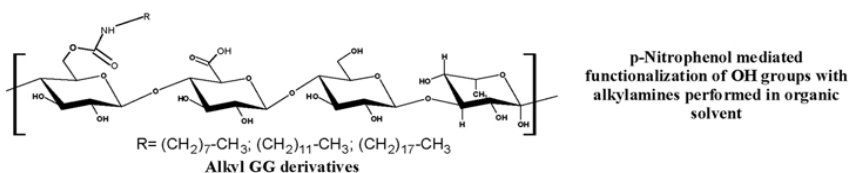
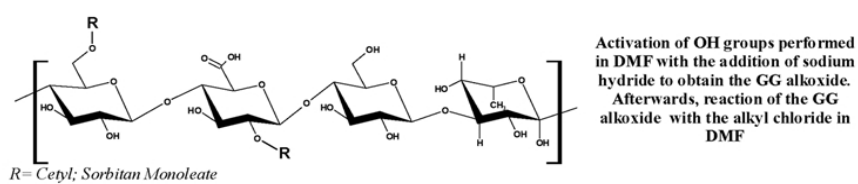
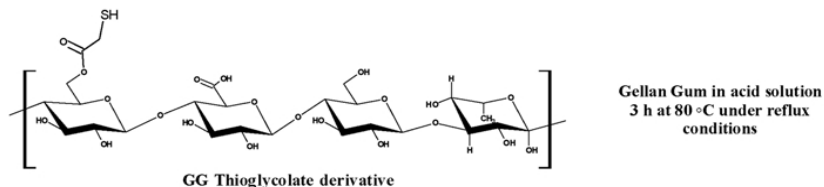
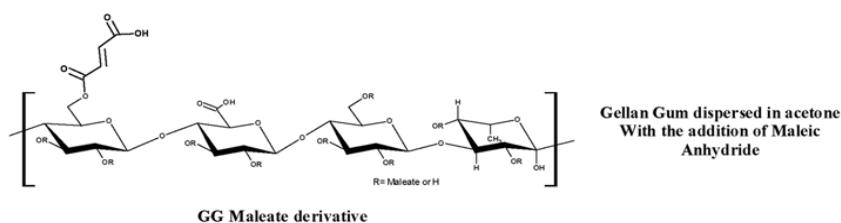
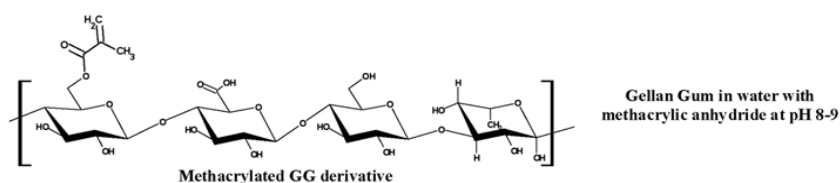
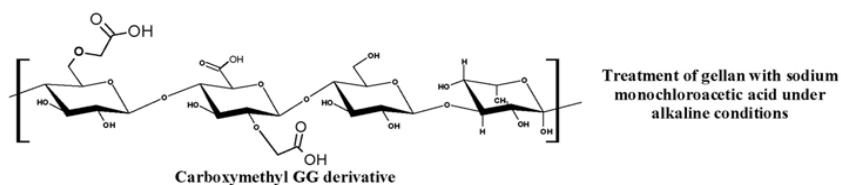
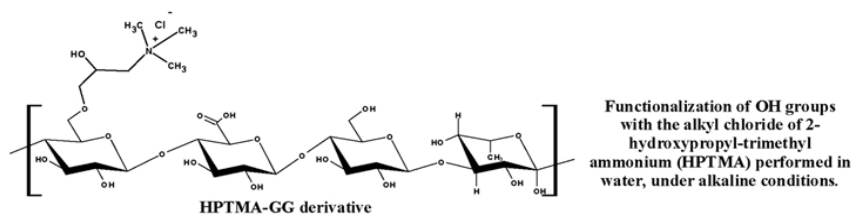
Figura 14. Rappresentazione schematica della funzionalizzazione biologica degli idrogeli di GG mediante combinazione con peptidi contenenti RGD e proteine (Bacelar, et al., 2016)

Nonostante le peculiarità della gomma gellano, le sue limitazioni possono essere superate. Ad esempio, per migliorare le proprietà meccaniche e aumentare la stabilità *in vivo* sono state messe a punto diverse strategie come la combinazione con altri biomateriali o attraverso modifiche chimiche (Ferris, et al., 2013b). Nello specifico, la gomma gellano può essere facilmente modificata chimicamente grazie alla presenza di diversi gruppi ossidrilici e di un gruppo carbossilico libero nell'unità di acido glucuronico (Bacelar, et al., 2016; Silva-Correia, et al., 2016).

Questo permette di modulare adeguatamente le caratteristiche dei suoi idrogeli (Palumbo, et al., 2020) per renderli idonei allo scopo prefissato.

Diversi derivati della gomma gellano sono mostrati in Figura 15 dove le reazioni sono state classificate considerando il tipo di procedura chimica e i gruppi funzionali coinvolti nel legame chimico (Palumbo, et al., 2020).

Functionalization of OH groups



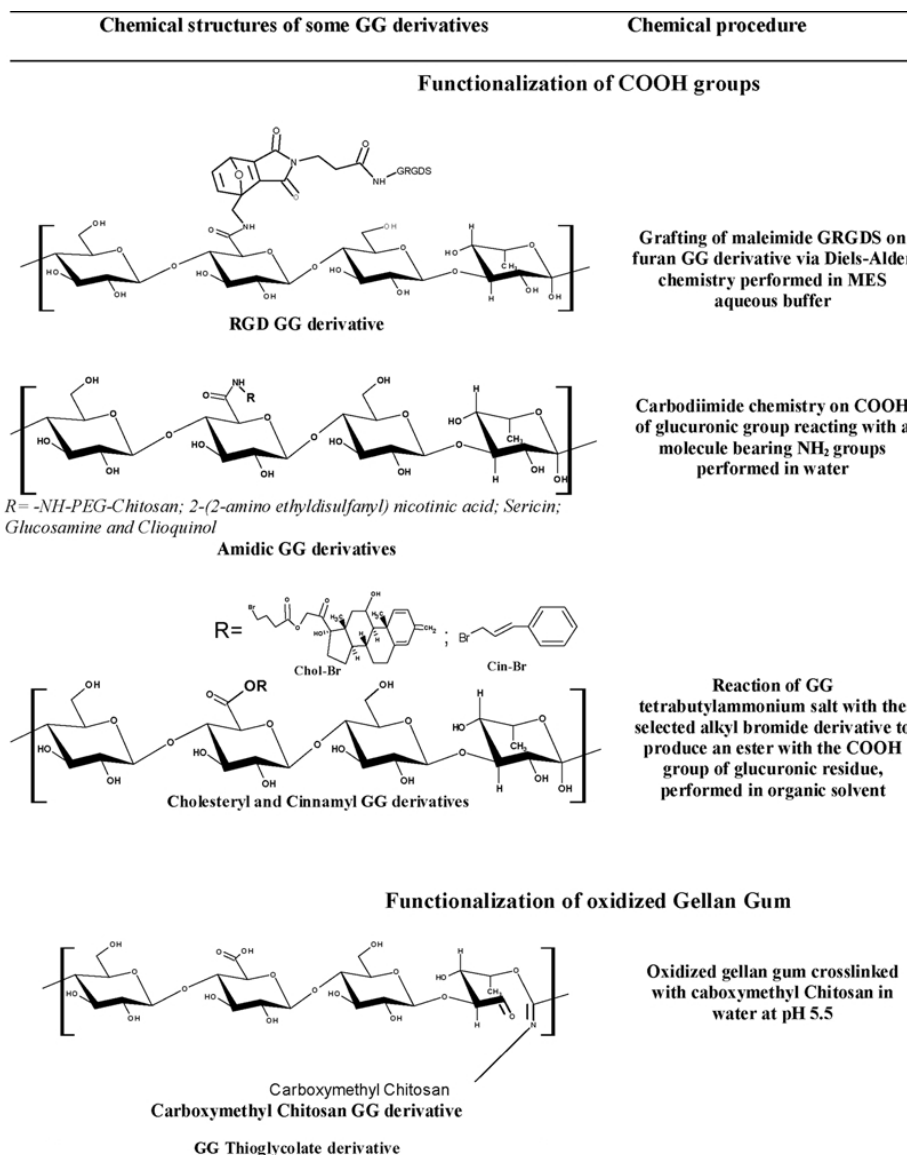


Figura 15. Strutture chimiche di alcuni derivati della gomma gellano (Palumbo, et al., 2020)

Una delle modifiche covalenti più frequentemente eseguite sulla gomma gellano è la metacrilazione che ne consente la reticolazione foto-indotta. Diversi studi hanno messo in evidenza le prestazioni meccaniche e biologiche della gomma gellano metacrilica (MA-GG) (Silva-Correia, et al., 2013a; Silva-Correia, et al., 2013c) e le ottimizzazioni del processo di metacrilazione (Bartnikowski, et al., 2015).

Un'altra soluzione per migliorare le proprietà meccaniche della GG è la combinazione con materiali inorganici, per esempio con particelle fini di vetro bioattivo (BAG) (Gantar, et al., 2014; Douglas, et al., 2014), con idrossiapatite (HAp) (Pereira, et al., 2014; Manda-Guiba, et al., 2012) o con fosfato di calcio (CaP) (Douglas, et al., 2016). Ogni proprietà del polimero naturale può essere modificata in base al grado di derivatizzazione e alla tipologia delle funzionalità chimiche introdotte. Queste

modifiche hanno consentito di migliorare la resistenza degli idrogeli, variare la sensibilità al pH o migliorare le proprietà meccaniche, mucoadesive o gelificanti, nonché le proprietà reologiche degli idrogeli risultanti evidenziando l'incredibile versatilità di questo polisaccaride, il quale si è dimostrato idoneo per svariate applicazioni (Palumbo, et al., 2020).

Riguardo la specifica applicazione della gomma gellano nella biostampa 3D, va sottolineato come negli ultimi anni il suo utilizzo come *bioink* per la produzione di *scaffold* ha avuto grande successo. Questo polisaccaride è stato applicato come vettore cellulare, modificatore reologico o materiale strutturale ed è stato processato con stampanti a getto d'inchiostro ed estrusione. In tutti questi approcci, un tema unificante è la necessità di controllarne la velocità e la tempistica del *cross-linking* (Stevens, et al., 2016; Oliveira, et al., 2010b; Melchels, et al., 2014).

In letteratura vengono riportati svariati esempi di utilizzo della gomma gellano nella biostampa. Ad esempio, Lozano e coll. hanno applicato la tecnica dell'estrusione reattiva (*reactive extrusion printing*), in cui la GG viene estrusa contemporaneamente agli ioni Ca^{2+} , come mostrato in (Figura 16) (Lozano, et al., 2015) (Stevens, et al., 2016), per la formazione di una struttura corticale multistrato.

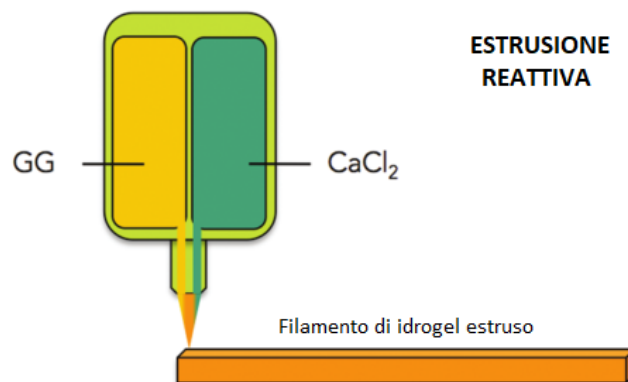


Figura 16. Rappresentazione schematica della biostampa per estrusione reattiva (Stevens, et al., 2016)

In questo studio è stato utilizzato un sistema di biostampa manuale che non necessita di dispositivi sofisticati. Come bioinchiostro ibrido è stata utilizzata la miscela costituita da gomma gellano e peptide RGD, in cui sono state incapsulate le cellule neurali primarie. I ricercatori hanno osservato che l'incorporazione di siti RGD nella gomma gellano ha indotto la crescita cellulare e la formazione di un *network* tridimensionale. I costrutti ottenuti mimano con accuratezza la microstruttura dei

tessuti cerebrali, pertanto potrebbero essere applicati come modello *in vitro* per lo studio dei processi e dei disturbi neurologici (Lozano, et al., 2015). Melchels e coll. hanno utilizzato un bioinchiostro composto da GG e gelatina metacrilata (GelMA), sfruttando le vantaggiose proprietà bioattive di GelMA e la migliore stampabilità complessiva della miscela. Questo composito è stato miscelato ad una soluzione salina per indurre la reticolazione ionica delle catene di GG e favorire le interazioni tra i residui di gomma gellano carichi negativamente e i residui di GelMA carichi positivamente. Successivamente è stata diminuita la temperatura, consentendo così la reticolazione fisica del GelMA. Infine, il polimero è stato ulteriormente reticolato, stavolta chimicamente, utilizzando raggi UV. I risultati hanno mostrato che l'aggiunta della gomma gellano ha migliorato la viscosità e quindi la stampabilità del *bioink*. Inoltre, non ha influenzato la microstruttura del costruito, né la sopravvivenza delle cellule osteoblastiche (Melchels, et al., 2014). Visser e coll. hanno utilizzato idrogeli a base di gomma gellano/gelatina-metacrilato in un approccio di stampa multi-materiale per la formazione di tessuti bioingegnerizzati (Visser, et al., 2013). Levato e coll. hanno stampato anche miscele di gelatina metacrilammide e gomma gellano, seminando in questo caso cellule nello *scaffold* con l'aiuto di microcarrier di acido polilattico (PLA) (Levato, et al., 2014). In entrambi i casi, i ricercatori hanno applicato la fotoreticolazione della gelatina metacrilata come passaggio chiave nella fabbricazione dello *scaffold*. Tali approcci di reticolazione UV sono stati recentemente evidenziati come mezzo promettente per controllare accuratamente gli *scaffold* biostampati (Kirchmayer, et al., 2015).

1.3.2 Acido ialuronico

L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride naturale ampiamente utilizzato nella ricerca biomedica data la sua citocompatibilità, le sue proprietà biologiche e la disponibilità verso le funzionalizzazioni chimiche (Prestwich, 2011). L'HA un glicosaminoglicano non solfato, presente nella matrice extracellulare, specialmente della cartilagine e dei tessuti connettivi (Yoo, et al., 2005) è costituito dalla ripetizione di unità disaccaridiche di acido D-glucuronico e di N-acetil-D-glucosamina con un peso molecolare medio (MW) compreso tra 10^5 e 10^7 Da, a seconda del tessuto di origine (Figura 17).

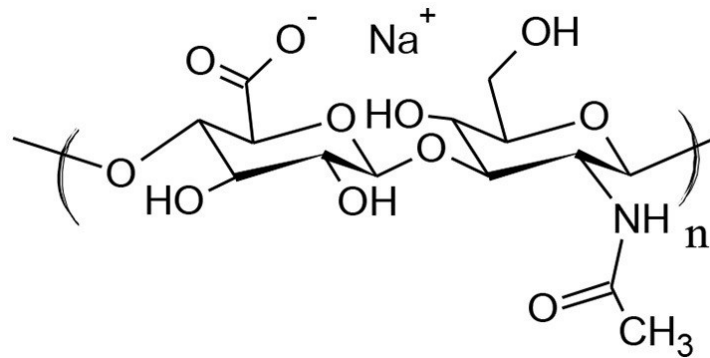


Figura 17. Struttura dell'unità ripetitiva dell'acido ialuronico

L'acido ialuronico (HA), presenta proprietà vantaggiose nella costruzione di tessuti ossei e cartilaginei (Gungor-Ozkerim, et al., 2018) ma va incontro ad una rapida degradazione *in vivo* e possiede scarse proprietà meccaniche. Per tale motivo è stato spesso utilizzato in miscela con altri polimeri, sottoforma di derivati o viene opportunamente reticolato (Petta, et al., 2020).

Nell'ultimo decennio, gli idrogeli a base di HA sono stati studiati come *bioink* per la stampa 3D grazie alle loro proprietà pseudoplastiche, alla loro funzione di supporto e protezione cellulare durante il processo di estrusione e di mantenimento della forma post-stampa.

Ad oggi, solo pochi studi utilizzano l'HA come componente principale per la preparazione di *bioink* (Ouyang, et al., 2016a).

L'HA non modificato alle concentrazioni di lavoro, non è adatto per produrre inchiostri stampabili. In effetti, le dispersioni acquose di HA forniscono preparazioni viscosi con prevalenza del modulo viscoso e con mancanza di un punto di scorrimento e scarsa capacità di mantenere la forma dopo la deposizione. Quindi, l'HA di solito non è in grado di resistere al processo di stampa, e piuttosto che stampato tal quale, si combina con altri biomateriali, sia polimeri naturali che sintetici. Nel 2013, Kesti e coll. hanno stampato una combinazione di due HA modificati, un HA termosensibile al 15% p/v, graftato con Poly (N-isopropilacrilamide) (pNIPAAM) e miscelato con HA metacrilato (HAMA) al 2% p/v (Kesti, et al., 2015). Il primo componente ha assicurato una rapida gelificazione e il mantenimento della forma iniziale, mentre l'HAMA ha conferito stabilità strutturale a lungo termine dopo la reticolazione UV. Il materiale termosensibile potrebbe anche essere rimosso dopo l'irradiazione UV per creare ulteriore porosità.

Park e coll. hanno combinato HA e collagene di tipo I (Col-I), i principali componenti organici dell'ECM della cartilagine e dell'osso, per l'ottenimento di un'interfaccia osteocondrale (Figura 18).

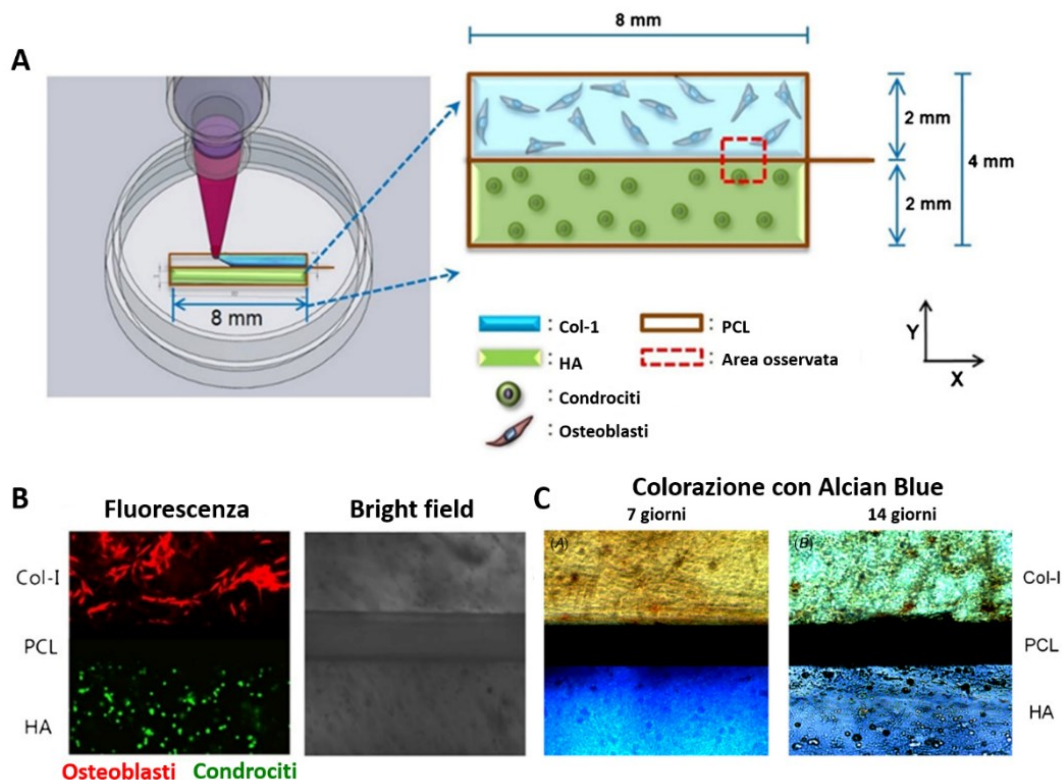


Figura 18. (A) Rappresentazione schematica dell'interfaccia osteocondrale biostampata. (B) Immagine al microscopio confocale delle cellule nel costruito biostampato. (C) Valutazione istologica della struttura osteocondrale marcata con Alcian Blue e incubata per 7 e 14 giorni (Park, et al., 2014a)

In particolare, per lo strato cartilagineo è stato impiegato un *bioink* costituito da HA e condrociti, mentre per lo strato osseo è stato utilizzato Col-I contenente osteoblasti. Il costruito a doppio strato, come si può osservare in Figura 18, è stato realizzato all'interno di due porzioni rettangolari stampate in PCL che avevano la funzione di supporto. I risultati sperimentali hanno mostrato che vitalità e funzione di entrambi i tipi cellulari sono state mantenute *in vitro* fino a 14 giorni (Park, et al., 2014a).

Inoltre le proprietà dell'HA possono essere adeguatamente modulate anche mediante reticolazione o funzionalizzazione chimica (Yamamoto & Cunha, 2007).

In particolare, i derivati metacrilati dell'HA sono molto utilizzati nella preparazione di *bioinks*. Nello specifico, Poldervaart e coll. hanno utilizzato un idrogel a base di HA metacrilato: l'aggiunta del gruppo metacrilato ha consentito un meccanismo di fotoreticolazione per la gelificazione, con migliori proprietà meccaniche ed elevata

stabilità dopo la stampa rispetto all'HA non funzionalizzato né reticolato (Petta, et al., 2020). Dopo l'esposizione ai raggi UV è stato osservato un aumento significativo del modulo elastico (G') per tutte le concentrazioni di polimero. Inoltre, il valore di G' è aumentato variando la concentrazione di HAMA dall'1 al 3% p/v (Poldervaart, et al., 2017). Poldervaart e coll. hanno riportato una vitalità cellulare del 64% dopo 21 giorni per le cellule staminali mesenchimali (MSC) incorporate negli idrogeli HAMA. Inoltre, gli idrogeli con concentrazioni di HAMA del 2.5 - 3% p/p hanno indotto la differenziazione osteogenica delle MSC senza l'uso di ulteriori stimoli osteogenici (Poldervaart, et al., 2017).

In un altro studio, Lee e coll. hanno sviluppato un *bioink* ibrido composto da due differenti derivati dell'HA, HA acrilato e HA modificato con tiramina (HA-Tyr), incapsulandovi cellule staminali mesenchimali umane (hMSC). I due derivati avevano funzioni differenti: il primo legava, mediante il gruppo acrilico, peptidi biofunzionali in grado di influenzare il differenziamento cellulare, mentre il secondo contribuiva a mantenere l'integrità strutturale del *bioink* e del successivo estruso, tramite reazione di reticolazione enzimatica (Lee, et al., 2018).

In generale, l'HA è stato utilizzato principalmente nei *bioinks* in combinazione con altri polimeri (Noh, et al., 2019). In un primo lavoro di Skardal e coll., l'HAMA è stato miscelato con un derivato metacrilato della gelatina (rapporto 4:1) incapsulando cellule tumorali del fegato. Una foto-reticolazione parziale (365 nm per 120 s) è stata applicata per ottenere una formulazione estrudibile, stabilizzata irradiando con luce UV dopo la stampa (Skardal, et al., 2010a).

L'HA è stato anche miscelato con polimeri sintetici. Ad esempio, Song e coll. hanno miscelato l'HA con un *bioink* a base di polietilenglicole (PEG) per migliorare le proprietà pseudoplastiche del PEG (Song, et al., 2010). Invece, nello studio di Mouser, l'HAMA è stato miscelato con il copolimero termosensibile composto da Poli [N-(2-idrossipropil) metacrilammide mono/di lattato] (pHPMA-lac) e PEG (Mouser, et al., 2017). In questo caso, i condrociti sono stati incapsulati nella formulazione con una concentrazione di HAMA compresa tra lo 0% e l'1% p/p. L'HAMA allo 0.5% p/p ha portato alla formazione di un tessuto simile a quello cartilagineo.

Inoltre, l'HA e i suoi derivati sono stati utilizzati specificamente per migliorare sia la viscosità delle formulazioni dei *bioink* (Shin & Kang, 2018), sia la stabilità meccanica finale (Costantini, et al., 2016) e le proprietà biologiche (Müller, et al., 2015). Nel lavoro di Müller e coll., l'HAMA è stato aggiunto a un *bioink* a base di Pluronic,

promuovendo un aumento sia della temperatura di gelificazione di quest'ultimo, sia del modulo di conservazione finale dei costrutti stampati (Müller, et al., 2015).

Uno degli svantaggi dell'HA è la scarsa stabilità meccanica; per tale motivo è stata adottata una strategia che prevede l'uso di un materiale di supporto come il PCL. Rispetto alle macromolecole naturali, i polimeri sintetici mostrano tipicamente proprietà meccaniche migliori e un buon controllo del tempo di degradazione. Tuttavia, spesso presentano una limitata biocompatibilità e potrebbero produrre sottoprodotti non degradabili o tossici. Nel lavoro di Stichler e coll., sono stati fabbricati costrutti 3D alternando PCL con una soluzione di HA solfato miscelato con un polimero sintetico come reticolante (Stichler, et al., 2017). L'idrogel ottenuto possedeva un'elevata fedeltà di forma, stabilità chimica dei costrutti stampati ed elevata vitalità cellulare con differenziazione condrogenica delle hMSC incorporate, mentre l'aggiunta di PCL ha fornito una resistenza meccanica ottimale ai costrutti stampati.

Duan e coll. hanno analizzato il comportamento reologico e la stampabilità di miscele di idrogeli costituite da HAMA e GelMA (Duan, et al., 2014). La viscosità dell'idrogel è stata determinata in funzione dello sforzo di taglio per miscele polimeriche HAMA/GelMA con differenti concentrazioni. Entro l'intervallo di sollecitazione (100-800 Pa), che normalmente si verifica durante l'estrusione, la stampa 3D dell'idrogel ibrido con la più bassa concentrazione di HAMA, ha mostrato una viscosità inferiore a 100 Pa·s, risultando troppo fluida per mantenere la forma stampata. Al contrario, gli idrogeli HAMA/GelMA con la più alta concentrazione di HAMA, hanno mostrato una viscosità superiore a 10^4 Pa·s, così da essere troppo viscosi per essere depositati facilmente. Pertanto, l'ibrido con concentrazione intermedia di HAMA è stato selezionato come *bioink*.

L'uso di polimeri sintetici come modificatori reologici o agenti addensanti si è dimostrato un metodo valido ed efficace per migliorare la stampabilità e la riproducibilità della forma dell'HA. Ad esempio, il Pluronic è stato utilizzato in diverse applicazioni, tra cui la somministrazione di farmaci, nel *wound healing*, nella stampa 3D e come materiale sacrificale. I suoi gel mostrano proprietà pseudoplastiche e buone capacità di recupero del modulo elastico, caratteristiche cruciali per la stampa 3D per estrusione.

Per tutti i *bioink* a base di HA, carichi di cellule, la vitalità cellulare 24 ore dopo la stampa è superiore al 70%. In uno studio recente, Abbadessa e coll. hanno riscontrato

una vitalità cellulare tra l'85% e il 95% a 1 e 7 giorni dopo la stampa di condrociti incapsulati in *bioink* di HAMA, suggerendo una buona citocompatibilità e nessun effetto negativo dovuto alla procedura di stampa (Abbadessa, et al., 2016b). Per ottenere *bioink*, molti studi si sono concentrati sullo sviluppo di formulazioni basate sulla combinazione di HA puro, derivati dell'HA e una varietà di polimeri sintetici e naturali. Per la stampa 3D è stato utilizzato HA con peso molecolare compreso tra 120 e 2500 kDa e concentrazioni di polimero comprese tra 0.1% p/v e 4% p/v, generando costrutti con un ampio spettro di proprietà meccaniche e alto indice di biodegradazione (Burdick & Prestwich, 2011). Inoltre, è ben nota la differenza tra l'HA ad alto e basso M_w , poiché il peso molecolare influisce su diverse funzioni biologiche come infiammazione, migrazione cellulare, vascolarizzazione, divisione cellulare e differenziazione (Burdick & Prestwich, 2011). L'HA a basso M_w promuove la produzione di mediatori infiammatori, mentre l'HA ad alto M_w inibisce la produzione dei mediatori dell'infiammazione (Cyphert, et al., 2015).

Diverse sono le applicazioni cliniche dei *bioink* basati sull'HA riportate in letteratura fino ad oggi. Di questi studi, solo pochi presentano indagini *in vivo*. L'applicazione in medicina rigenerativa più studiata è la rigenerazione della cartilagine, in linea con il costante interesse della ricerca in questo campo (You, et al., 2017), poiché l'HA ha naturali proprietà condrogeniche (Kim, et al., 2011). Inoltre, la cartilagine è avascolare e costituita da un unico tipo di cellule con densità relativamente bassa e le sue proprietà sono determinate principalmente dalla sua matrice.

In particolare, l'HA è stato impiegato principalmente in miscela con polimeri naturali (GelMA o gellan gum) (Mouser, et al., 2020; O'Connell, et al., 2016) o da solo come viscosupplementante (Costantini, et al., 2016; Hung, et al., 2016); in alcuni lavori è stato anche utilizzato come componente principale (Kesti, et al., 2015) o in combinazione con il policaprolattone (PCL) (Valot, et al., 2019).

Un *bioink* per la rigenerazione della cartilagine è stato proposto da Stichler e coll. (Stichler, et al., 2017). Studi *in vitro*, con hMSC, hanno mostrato risultati promettenti in termini di differenziazione condrogenica dopo 21 giorni. La formulazione ha stimolato la produzione di ECM cartilagine-specifica da parte delle cellule incapsulate, come sottolineato dall'analisi quantitativa del glicosaminoglicano (GAG) e del collagene.

Shim e coll. hanno valutato la riparazione dei difetti osteocondrali *in vivo* con idrogeli a base di HA stampati in 3D (Shim, et al., 2016). Gli idrogeli meccanicamente stabili

e citocompatibili hanno prodotto tessuto osteocondrale di buona qualità nelle articolazioni del ginocchio di coniglio dopo 8 settimane. I nuovi tessuti cartilaginei rigenerati sono stati integrati con il tessuto cartilagineo ospite. Inoltre, non è stata riscontrata alcuna differenza morfologica tra la cartilagine nativa e la neo-cartilagine.

1.4 Requisiti di un idrogel come *bioink*

I requisiti di un idrogel, per quanto riguarda il processo di *bioprinting* e la coltura cellulare, sono spesso opposti. Una possibile soluzione a questo problema consiste nel combinare un idrogel con materiali che forniscono stabilità meccanica e facilitano la fedeltà della forma (Malda, et al., 2013).

Le caratteristiche del *bioink* dovrebbero soddisfare i requisiti reologici e meccanici per il processo di *bioprinting* e allo stesso tempo garantire la sopravvivenza delle cellule incapsulate (Levato, et al., 2014). Tuttavia spesso migliorare le caratteristiche del *bioink* in termini di processazione si traduce con inevitabili effetti sulle cellule incapsulate con spesso una riduzione della vitalità. Esiste, infatti, una relazione tra le proprietà fisiche di un *bioink*, la sua stampabilità e la sua idoneità per l'incorporazione di cellule viventi. La stampabilità di un *bioink* è la capacità del materiale di essere manipolato, depositato strato per strato e modellato in una struttura 3D. Questa è caratterizzata da alta fedeltà di forma, alta risoluzione, adeguate proprietà meccaniche per applicazioni specifiche e sufficiente stabilità/integrità durante o dopo il processo di stampa (Ning, et al., 2018) utile per consentire la deposizione corretta dei filamenti. Con il termine stampabilità (*printability*) si indicano tutte le proprietà che facilitano la manipolazione e la deposizione del bioinchiostro; possono includere viscosità, metodi di gelificazione e proprietà reologiche (Choi, et al., 2016; Cui, et al., 2017).

La stampabilità viene anche influenzata dalla facilità con cui il biomateriale può essere reticolato ed è indice della riproducibilità del modello digitale selezionato, garantendo la realizzazione di costrutti di alta qualità (Mandrycky, et al., 2016).

Wu e coll. (Wu, et al., 2018a) hanno valutato la stampabilità degli idrogeli impiegati progettando tre modelli diversi: a griglia, a cilindro cavo e a stella, riportati in Figura 19.

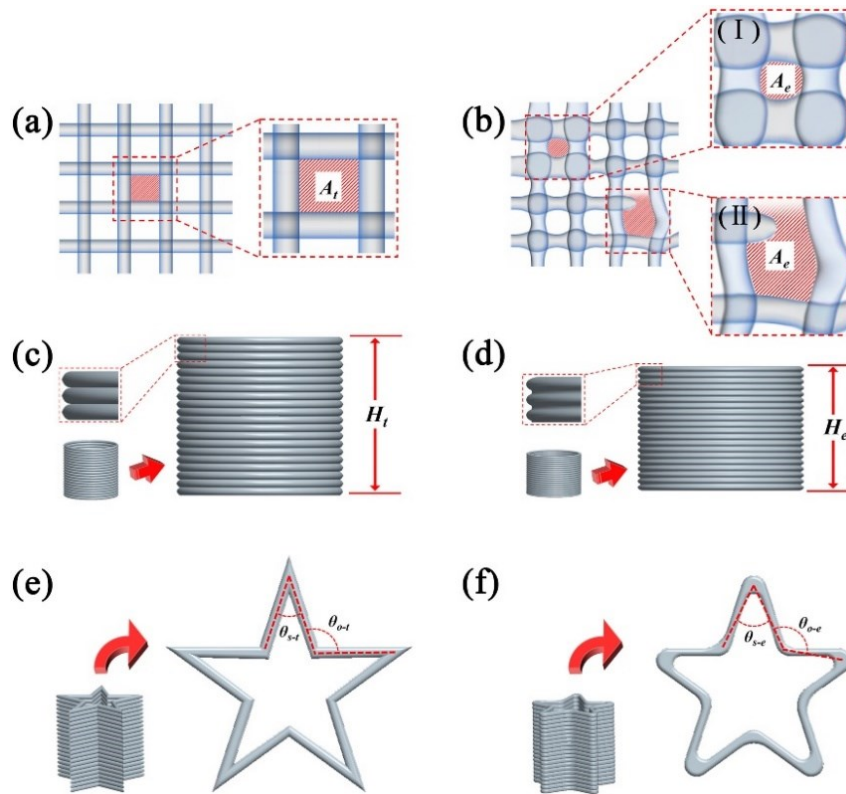


Figura 19. Modelli teorici (a, c, e) e forme effettive (b, d, f) delle strutture a griglia, cilindro cavo e stella stampate; (b) (I) Griglia stampata con un bioink troppo fluido e (II) Griglia stampata con un bioink troppo viscoso (Wu, et al., 2018a)

Per quanto riguarda il primo modello, gli autori hanno calcolato la stampabilità attraverso il parametro indice della fedeltà dell'area della maglia, indicato come F_{ma} (*fidelity on mesh area*) con la seguente equazione:

$$F_{ma} = \frac{A_e}{A_t}$$

dove A_e rappresenta l'area della maglia ottenuta sperimentalmente mentre A_t rappresenta l'area della maglia teorica, derivante dal modello digitale.

Per la struttura a cilindro cavo, invece, la stampabilità è stata calcolata valutando la riproducibilità della stampa attraverso il parametro F_h (*fidelity on height*) che tiene conto dell'altezza ottenuta rispetto a quella teorica.

Questa è definita come nell'equazione:

$$F_h = \frac{H_e}{H_t}$$

dove H_e corrisponde all'altezza del costruito stampato mentre H_t indica l'altezza del modello progettato.

Infine, allo scopo di valutare la riproducibilità nella stampa di costrutti con angoli che, rispetto ad una struttura lineare o circolare, spesso sono causa di una scarsa stampabilità in quanto l'ugello cambia bruscamente direzione durante l'estrusione (He, et al., 2016), si è presa in considerazione la deviazione angolare (D_a) di angoli sia acuti che ottusi con la seguente equazione:

$$D_a = \frac{\theta_e - \theta_t}{\theta_t}$$

In questa equazione θ_e rappresenta il valore dell'angolo ottenuto, mentre θ_t rappresenta il valore dell'angolo teorico.

In generale, la valutazione dell'area della maglia, dell'altezza o della deviazione angolare dei modelli strutturali, può riflettere pienamente la stampabilità del materiale e la fedeltà della struttura ottenuta al modello 3D.

Per quanto riguarda invece le proprietà reologiche, in generale i *bioinks* devono essere dei fluidi viscoelastici a bassa tiosotropia per potere fluire liberamente in fase di stampa, proteggere le cellule dalle sollecitazioni meccaniche necessarie per l'estrusione e gelificare velocemente in seguito alla deposizione del costrutto.

I classici idrogeli non sempre presentano le caratteristiche idonee allo scopo a cui sono destinati, diventa necessario migliorare le loro proprietà reologiche attraverso modulazioni come la miscelazione con addensanti o la reticolazione parziale (Williams, et al., 2018). È fondamentale però, che queste modulazioni, mantengano l'omogeneità del *bioinks* per prevenire l'aggregazione che può provocare la deposizione di filamenti non uniformi.

La viscosità del *bioink* deve essere adatta a favorire una distribuzione omogenea delle cellule al loro interno. Inoltre, risulta di cruciale importanza la comprensione della relazione tra la viscosità e la pressione che deve essere esercitata durante il processo di biostampa. Nello specifico, è fondamentale che il *bioink* mostri un comportamento pseudoplastico, ossia che la sua viscosità diminuisca all'aumentare dello sforzo di taglio (Cooke & Rosenzweig, 2021). Questo comportamento è definito *shear thinning* ed è un indice della facilità con la quale le molecole si allineano nella direzione di applicazione dello sforzo di taglio.

In genere, i *bioinks* con viscosità più elevata mostrano una migliore ritenzione della forma; tuttavia, questo si ripercuote negativamente sulla vitalità delle cellule che risulta compromessa dallo sforzo di taglio generato per permettere l'estrusione. Al contrario, le soluzioni con viscosità inferiore mostrano una più facile estrusione e

trasmettono uno sforzo di taglio ridotto alle cellule, ma contemporaneamente producono strutture molto fluide che spesso non sono in grado di mantenere la forma dopo la stampa (Duan, et al., 2014). Le dispersioni pseudoplastiche mostrano una diminuzione della viscosità all'aumentare dello sforzo di taglio e per questo rappresentano ideali candidati per la tecnica di stampa ad estrusione. Pertanto, l'elevata viscosità iniziale che consente una migliore stabilità (in termini di forma) del costruito stampato e la capacità di scorrimento quando è applicata una forza con conseguente riduzione del valore di viscosità, costituiscono proprietà desiderabili e ricercate. Inoltre il processo di stampa richiede proprietà viscoelastiche, al fine di superare le forze di tensione superficiale ed ottenere l'estrusione dei filamenti in modo continuo con forma cilindrica, così da poter sovrapporsi agli strati prestampati. Per preservare un'elevata fedeltà di stampa al modello digitale ed evitare l'appiattimento dei filamenti ottenuti in uscita dall'ugello, dopo l'estrusione (condizione in cui è sottoposto ad elevate deformazioni: *high shear*) il materiale da stampare deve essere in grado di recuperare i valori di modulo elastico iniziale quando il *bioink* si trova in condizioni di riposo non soggetto a forze.

Un altro parametro reologico molto importante per lo studio della stampa di un *bioink* è lo *yield stress*, che rappresenta il minimo valore di sforzo di taglio necessario per generare una deformazione permanente nel fluido e metterlo in movimento. Per un dato *bioink*, basse pressioni di stampa (rispetto al suo *yield stress*) possono provocare un'estrusione insufficiente mentre, al contrario, pressioni elevate possono provocare un flusso instabile e discontinuità del processo di stampa. Pertanto, risulta chiaro che è necessario attuare un controllo fine dello sforzo di taglio applicato, e quindi della pressione di stampa, per ottenere l'estrusione di filamenti continui che potranno generare il costruito con un'alta definizione morfologica. Oltre alle proprietà reologiche del *bioink* anche la geometria dell'ugello e la velocità di traslazione dello stesso potranno influenzare la pressione di stampa (Ahn, et al., 2017).

Dal punto di vista biologico, i *bioinks* devono avere un grado di idratazione adatto a consentire la diffusione dei nutrienti dall'ambiente circostante, devono essere atossici e scarsamente immunogenici e devono promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare che porterà alla maturazione del tessuto funzionale (Hospodiuk, et al., 2017). La citotossicità dipende non solo dalla deformazione applicata ma diversi sono i parametri da tenere in considerazione quali la composizione e i metodi di reticolazione, lo stress meccanico al quale sono sottoposte le cellule durante l'incapsulazione, lo

swelling (Okay, 2010), la geometria (conico, cilindrico) e il diametro dell'ugello di stampa (Billiet, et al., 2014; Blaeser et al., 2016). In particolare, la sollecitazione di taglio all'interno dell'ugello aumenta al diminuire del diametro dell'ugello.

Spesso per migliorare la stampabilità si può ricorrere a processi di reticolazione che permettono di generare costrutti fedeli al modello digitale. Un ulteriore fattore, infatti, da tenere in considerazione per le sue ripercussioni sulla vitalità è il metodo e il grado di reticolazione in quanto una matrice eccessivamente reticolata non consente una corretta diffusione di sostanze nutritive e di scarto e i processi chimici o fisici possono essere di per sé tossici.

In particolare, il grado di *crosslinking* ha un forte impatto sulle capacità di *swelling* e l'aumento del grado di reticolazione si traduce in una riduzione della capacità di rigonfiamento, riducendo, come detto prima, la diffusione di ossigeno e sostanze nutritive necessarie per la sopravvivenza cellulare (Bencherif, et al., 2008). Per questo motivo, gli idrogeli altamente reticolati che danno origine a costrutti con buona fedeltà di forma, non sempre si sono rilevati ottimali anche dal punto di vista biologico (Malda, et al., 2013).

Per migliorare il processo di stampa sono stati messi a punto, nel corso degli anni, diversi meccanismi di gelificazione che possono essere generalmente suddivisi in fisici e chimici. Nel primo caso si forma un idrogel fisico che risulta reversibile ed è il risultato del verificarsi di interazioni ioniche, di *entanglements* tra le macromolecole, di legami a idrogeno e/o di interazioni idrofobiche (Mignon, et al., 2015). Tuttavia, questa tipologia di idrogeli, nonostante permetta l'estrusione applicando una deformazione moderata, è solitamente associata ad una scarsa stabilità meccanica (Dababneh & Ozbolat, 2014). Per questa ragione, possono essere introdotti nuovi gruppi funzionali in grado di formare legami covalenti (Ullah, et al., 2015). Spesso la reticolazione chimica è utilizzata post-stampa come procedura di fissazione del costrutto ottenuto (Dababneh & Ozbolat, 2014), processo che prevede un forte controllo anche del tempo di gelificazione. Per tale motivo, per preservare la forma minimizzando così il collasso della struttura è necessario controllare la cinetica di reticolazione di un idrogel dopo la deposizione dell'estruso (Malda, et al., 2013). La velocità di gelificazione permette di ottenere uno stampato che rappresenta fedelmente il modello digitale creato in fase di progettazione. Ovviamente, i costrutti biostampati devono mantenere nel tempo la forma progettata, le proprietà meccaniche e l'integrità strutturale (Ramesh, et al., 2021).

Contestualmente a quanto detto, quando si progetta un *bioink*, un ulteriore aspetto da considerare, in grado di influenzare sia la vitalità cellulare che le proprietà reologiche del biomateriale, è l'effetto stesso delle eventuali cellule presenti. Sebbene un'elevata densità iniziale di cellule nel costrutto possa portare a una più rapida formazione dei tessuti, la loro incapsulazione può modificare in modo significativo la stampabilità del *bioink* di partenza.

Sono, in realtà, presenti pochi studi in letteratura che mettono in evidenza questo aspetto (Billiet, et al., 2014; Diamantides, et al., 2019; Maisonneuve, et al., 2013; Maisonneuve, et al., 2015; Mauck, et al., 2003; Skardal, et al., 2010b; Wang, et al., 2009; Xu, et al., 2014). L'incapsulamento cellulare, e in particolare la densità cellulare può dare effetti diversi sulle proprietà reologiche del *bioink* e questo dipende dal tipo di *bioink* e di cellule coinvolte.

Billiet e coll. hanno studiato la relazione tra le proprietà reologiche delle gelatine modificate con metilacrilammide e la densità cellulare (Billiet, et al., 2014). Quando la densità cellulare era di 1.5×10^6 cellule/ml, la viscosità del materiale è risultata essere la metà rispetto al materiale privo di cellule. Quando la densità delle cellule era di 2.5×10^6 cellule/ml, la viscosità del materiale si è ridotta a un quarto. Nel lavoro di Skardal e coll., la presenza di cellule epiteliali intestinali umane o fibroblasti murini ha influenzato la formazione degli idrogel a base di HAMA co-reticolati con un derivato della gelatina MA al 2%. Densità cellulari superiori a 25×10^6 ml hanno interferito con la formazione di idrogeli (Skardal, et al., 2010b). In ogni caso, però, sono stati osservati sia aumenti quanto diminuzioni dei valori di viscosità dei *bioink* contenenti cellule, rispetto a quelli che ne erano privi. Tuttavia, non è possibile generalizzare tale effetto, giacché dipende, chiaramente, in larga parte dalla natura chimica del *bioink*, dal tipo di cellule presenti e, anche, dalla loro densità cellulare.

Un passaggio fondamentale nella preparazione dei bioinchiostri per la biostampa risulta essere la sterilizzazione. La maggior parte degli idrogeli iniettabili a base di HA per uso clinico sono sterilizzati in autoclave o filtrati sterilmente se la loro viscosità è bassa (Huerta-Ángeles, et al., 2018). Entrambi i processi hanno un impatto sulle proprietà reologiche, a causa della scissione della catena indotta dal calore o dalla filtrazione (Lorson, et al., 2020). Pertanto, considerata l'importanza del profilo viscoelastico per la stampabilità, va considerato l'impatto del processo di sterilizzazione durante la progettazione dei *bioinks*.

Per concludere è possibile controllare i diversi parametri di stampa come la temperatura, il diametro dell'ugello, la velocità di estrusione, la pressione e la velocità di stampa per facilitare la deposizione di filamenti con uniformità costante. La stampabilità ideale si traduce in filamenti lisci che non perdano la loro forma o si fondano l'uno nell'altro dopo la stampa (He, et al., 2016). Altre caratteristiche come concentrazione, peso molecolare e contenuto di acqua del materiale, così come la temperatura del letto di stampa, possono influenzare la stabilità del filamento.

1.5 Strategie di progettazione per stampa ad estrusione

La presente tesi di Dottorato di Ricerca si concentra sui bioinchiostri per la stampa ad estrusione tenendo conto della strategia di progettazione di nuovi bioinchiostri. Nel *bioprinting*, il "bio" nel termine bioinchiostro si riferisce alle cellule come veri componenti biologici della formulazione. Tuttavia, il trattamento della componente biologica è complicato e limita drasticamente i processi a cui possono essere sottoposte le cellule. Pertanto, i biomateriali sono spesso necessari per aiutare la realizzazione della tecnologia di bioprinting, e ovviamente, questi possono essere modulati allargando la possibilità di processazione del *bioink*. Per tale motivo le caratteristiche del bioinchiostro sono al centro della ricerca attuale e diverse sono le strategie messe in atto nella progettazione di nuovi biomateriali da utilizzare in questo ambito (Holzl, et al., 2016)

1.5.1 Strategie nel bioprinting: Concentrazione del biomateriale

Il modo più semplice e diretto per regolare la stampabilità del bioinchiostro è quello di aumentarne la concentrazione per ottenere una viscosità più elevata. Di solito, vengono effettuati esperimenti per l'ottimizzazione della concentrazione e per vagliare e determinare la migliore formulazione di bioinchiostro. Tuttavia, non tutte le macromolecole possono essere estruse aumentando la concentrazione. Alcune macromolecole richiedono concentrazioni estremamente elevate per diventare bioinchiostri stampabili. Ad esempio, l'alta viscosità ottenuta aumentando la concentrazione di GelMA, raggiungerà il valore limite al 30 % p/v, causando una significativa diminuzione della vitalità cellulare dovuta alla presenza di una rete polimerica densa (Liu, et al., 2017; Yin, et al., 2018). Un'altra strategia per regolare la viscosità è stata quello di introdurre altre macromolecole. Lim e coll. hanno adeguato

la viscosità del bioinchiostro a base di GelMA con carbossimetilcellulosa (CMC) e gomma xantano (XG), ottimizzando il processo di estrusione (Lim, et al., 2021). Una maggiore viscosità è favorevole per la stampa, ma significa anche maggiore forza di taglio necessaria per l'estrusione, che può causare danni alle cellule. Anche se la maggior parte dei polimeri mostrano proprietà pseudoplastiche, un'eccessiva viscosità ottimizzata per la stampa può ancora avere un impatto significativo sulla sopravvivenza delle cellule durante il processo di stampa e la successiva coltura dopo la stampa. Recentemente, alcune nuove strategie di progettazione sono state utilizzate per evitare il rischio cellulare causato da una maggiore concentrazione. Un'emulsione acquosa a due fasi è stata fotoreticolata per fabbricare un idrogel contenente cellule costituito da una miscela di cellule/(GelMa) e poli(etilenossido) (PEO). La struttura porosa viene formata in seguito alla dissoluzione della fase PEO (Ying, et al., 2018). Questa strategia prevede l'utilizzo di un materiale conosciuto come "materiale sacrificale" che è eliminato dopo la stampa.

1.5.2 Strategie nel bioprinting: Uso di Nanoparticelle

Negli ultimi anni, le nanoparticelle sono state utilizzate per regolare la reologia dei bioinchiostri. Le nanoparticelle (NPs) possono fornire un controllo elevato sulle proprietà degli *scaffolds* come la regolazione della loro resistenza meccanica e il rilascio controllato di agenti bioattivi (Park, et al., 2012). Inoltre, inconvenienti e fattori limitanti quali bassa solubilità, instabilità e breve emivita delle molecole bioattive (fattori di crescita, citochine, inibitori, geni, farmaci, ecc.) e degli agenti di contrasto hanno reso le NPs uno dei candidati più idonei per la somministrazione di agenti bioattivi e il monitoraggio per applicazioni nel bioimaging (Bahal, et al., 2016; Colson & Grinstaff, 2012).

L'aggiunta di un piccolo numero di nanoparticelle ad un idrogel può alterare una varietà di proprietà chimiche e fisiche, tra cui le proprietà reologiche e la stabilità in condizioni fisiologiche (Kesti, et al., 2015). Inoltre diversi tipi di nanoparticelle possono possedere diverse proprietà (Gaharwar, et al., 2014), come attività biologica, conducibilità elettrica, reattività alla luce, magnetismo, ecc.

Insieme alle NPs, altri prodotti della tecnologia su scala nanometrica, come le nanofibre e le superfici nanostrutturate, sono stati utilizzati per orientare il comportamento delle cellule nel campo dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. Wu e coll. hanno progettato un bioinchiostro a base di alginato combinato

con nanocellulosa, che presenta buone proprietà reologiche e dimensioni stabili dopo la stampa (Wu, et al., 2018b) Markstedt e coll. hanno stampato la struttura dell'orecchio umano con materiali simili, confermando la buona biocompatibilità del materiale (Markstedt, et al., 2015). Altre nanoparticelle come l'argilla silicata sono ampiamente utilizzate anche nei bioinchiostri (Ahlfeld, et al., 2017).

Le nanoparticelle sono nanomateriali con un alto rapporto superficie-volume e una distribuzione di carica insolita. Tale struttura consente alle nanoparticelle di effettuare interazioni non covalenti con una varietà di polimeri, migliorandone la risposta pseudoplastica. Xavier e coll. hanno utilizzato nano-silicati per migliorare la matrice di collagene, con eccellenti proprietà reologiche e capacità di indurre la differenziazione ossea (Xavier, et., 2015).

L'aggiunta di nanoparticelle non solo può migliorare le prestazioni del bioinchiostro, ma anche influenzare il comportamento cellulare e regolarlo appositamente. Gao e coll. hanno esplorato la potenziale bioattività delle nanoparticelle di idrossiapatite (nHAp) nell'ingegneria dei tessuti ossei combinando il polietilenglicole dimetacrilato (PEGDMA) con le nHAp (circa 200 nm di diametro) e il vetro bioattivo (BG) (circa 20 μm) per la stampa 3D (Gao, et al., 2014). Hanno caricato cellule staminali mesenchimali umane in PEGDMA/nHAp/BG per la stampa, ottenendo un alto tasso di sopravvivenza cellulare (> 80%) e l'aggiunta di nanoparticelle di idrossiapatite ha consentito l'aumento dell'espressione genica correlata alle ossa, come collagene di tipo I ed osteocalcina.

Le NPs possono essere preparate con vari tipi di materiali come ceramica, metalli, polimeri naturali e sintetici (Figura 20).

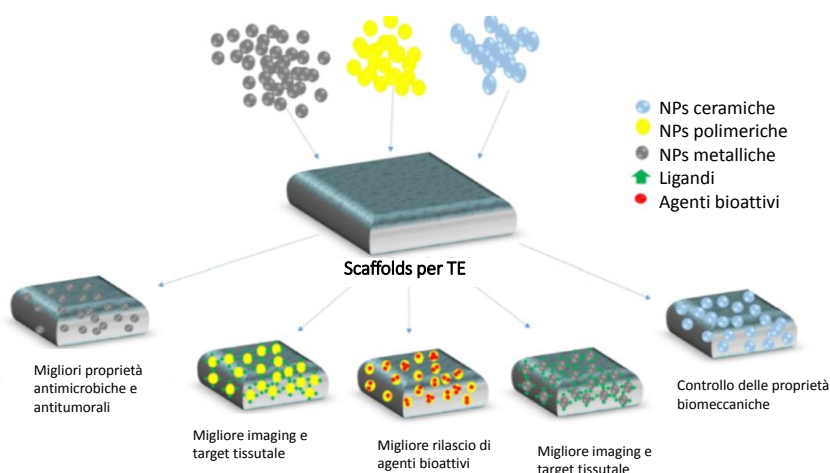


Figura 20. NPs usate per gli scaffold nell'ingegneria tissutale (Fathi-Achachelouei, et al., 2019)

In particolare verrà focalizzata l'attenzione su due grandi classi di nanoparticelle: metalliche e ceramiche (Fathi-Achachelouei, et al., 2019).

Nanoparticelle metalliche. Le NPs metalliche vengono generalmente utilizzate per la coniugazione di anticorpi, ligandi e come sistemi di rilascio di farmaci (Mody, et al., 2010). Essenzialmente si distinguono in nanoparticelle d'oro e d'argento. Un potenziale utilizzo delle nanoparticelle d'oro (AuNP) nel contesto della medicina rigenerativa è come tracciante atto a visualizzare la rigenerazione del tessuto/organo resecato ad esempio durante una terapia di *debulking* di un tumore primario; se esposte a una luce laser, esse si surriscaldano, inducendo la degradazione delle proteine nelle cellule tumorali, inoltre hanno la particolarità di accumularsi in modo spontaneo nelle cellule di diversi tipi di cancro.

Le nanoparticelle d'argento (AgNP) sono le più utilizzate in campo biomedico principalmente per le loro proprietà antimicrobiche (Prabhu & Poulouse, 2012), dato il significativo rischio di infezione batterica nei tessuti ingegnerizzati.

Nanoparticelle ceramiche. Le nanoparticelle ceramiche (CNPs) sono fondamentalmente costituite da composti inorganici, oltre a metalli, ossidi metallici e solfuri metallici e possono essere utilizzate su scala nanometrica con varie forme, dimensioni e porosità (Singh, et al., 2016). In generale, le CNPs possono essere classificate in base alla loro risposta tissutale come ceramiche inerti, bioattive o riassorbibili e NPs magnetiche (Oh, et al., 2006). Le nanoparticelle bioattive in vetroceramica (n-BGC) presentano strutture centrali di $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$ (Jones, 2015). Possono essere formate da vari elementi come silicio, sodio, potassio, magnesio, fosforo, ossigeno e calcio assorbibili dalle cellule. Sono state sviluppate varie tecniche per produrre vetri bioattivi su nanoscala come microemulsione, laser spinning e sintesi in fase gassosa (Uludag, et al., 2019). Le nanoceramiche biorassorbibili hanno una composizione a base di fosfato di calcio (CaP) che include una varietà di materiali come idrossiapatite (HAp), alluminato di calcio, fosfato tricalcico, fosfato bicalcico disidratato, carbonato di calcio (CaCO_3), solfato di calcio emiidrato, fosfato ottacalcico e fosfato di calcio bifasico. L'HAp è il componente principale (inorganico) dell'osso naturale e in condizioni neutre o alcaline è la forma più stabile di sali fosfati.

Strutture portanti, composte da nanoparticelle di HAp (nHAp), hanno mostrato diverse proprietà meccaniche, come il miglioramento della resistenza alla compressione del polimero a cui vengono aggiunte (Jones, 2015). Le nanoceramiche bioinerti, tra cui il

biossido di titanio (TiO₂) e l'ossido di zinco (ZnO), vengono utilizzate per diverse applicazioni mediche poiché mostrano interazioni positive con i tessuti. Nanoparticelle, nanotubi o nanosonde di TiO₂ etichettati con colorante fluorescente o agenti di contrasto a risonanza magnetica sono stati utilizzati, ad esempio, con successo per l'imaging cellulare (Jones, 2015).

1.5.3 Strategie nel bioprinting: Interazioni reversibili

Un controllo nel meccanismo di reticolazione è spesso utile e rappresenta una possibile via per il successo del processo di stampa. Metodi chimici e fisici presentano entrambi forti svantaggi, i primi dal punto di vista meccanico, i secondi dal punto di vista biologico. Attualmente, i metodi di reticolazione di tipo fisico includono una vasta gamma di legami tra cui legami a idrogeno, interazioni *host-guest*, interazioni elettrostatiche e interazioni metalli-ligando. Ogni tipo di interazione fisica presenta forze di legame specifiche che controllano le proprietà del materiale e la capacità *self-healing* (Uman, et al., 2020).

I legami a idrogeno svolgono un ruolo critico in molti sistemi biologici *self-healing* come l'appaiamento di basi del DNA e il ripiegamento proteico (Dill, 1990).

Per alcuni idrogeli termosensibili, l'aggregazione idrofobica e i legami ad idrogeno svolgono un ruolo importante nella reticolazione, che dipende principalmente dalla temperatura. Le proprietà reologiche del gel cambiano con la temperatura. Quando la dispersione polimerica si trova ad alta temperatura, le catene del polimero si trovano in uno stato disordinato con una distribuzione casuale, quando la temperatura diminuisce, le catene polimeriche formano una disposizione ordinata grazie a forze intermolecolari per formare un gel fisico (Jeong, et al., 2002). Ci sono anche sistemi che si comportano in maniera opposta e queste catene polimeriche hanno sia gruppi idrofili che idrofobi. A basse temperature, le molecole d'acqua possono dissolvere le regioni idrofile, permettendo ai polimeri di dissolversi in acqua. In questo momento, il legame a idrogeno esiste principalmente tra molecole d'acqua e catene polimeriche. Dopo che la temperatura aumenta, con l'aumento dell'entropia del sistema, i legami a idrogeno tra molecole d'acqua e polimeri si rompono, e l'interazione idrofoba tra le catene polimeriche risulta dominante nella formazione del gel.

Per quanto riguarda le interazioni *host-guest* risultano vantaggiose sia nell'ingegneria dei tessuti che nelle applicazioni per la somministrazione di farmaci (Rodell, et al., 2015). Questi legami si basano sull'associazione transitoria e sulla formazione di

complessi di inclusione tra una molecola contenente una cavità (ospitante) ed un idoneo ospite. La famiglia dei “cavitandi” comprende sia derivati naturali, come le ciclodestrine, che sintetici come i cucurbiturili (CBn) (Ma & Zhao, 2015). I criteri per la scelta di un *host-guest* sono la dimensione complementare della cavità dell’ospitante e le dimensioni dell’ospite (Rodell, et al., 2015).

Vanno ricordate, inoltre le interazioni elettrostatiche che consentono l'assemblaggio di polimeri e biomolecole in idrogeli, attraverso legami deboli per la presenza di ioni con formazione di nuovi legami crociati, garantendo proprietà *shear-thinning* e *self-healing*. Per esempio, l’alginato, polimero naturale, anionico e idrofilo reticola, in presenza di cationi (più tipicamente Ca^{2+}) e viene ampiamente utilizzato per l'ingegneria tissutale e la somministrazione di farmaci (Park & Park, 2018). Alcuni studi riportano anche l'alginato grafitato nei *backbones* di HA per creare un idrogel che reticoli fisicamente in presenza di ioni calcio per la rigenerazione della cartilagine (Park, et al., 2014a).

Per quanto riguarda le interazioni metallo-legante risultano essere presenti in molti fenomeni di natura biologica, tra cui adesione e *self-assembly*. Rispetto alle altre interazioni di tipo fisico, queste offrono stabilità quasi covalente a pH variabili (Holten-Andersen, et al., 2011).

In particolare, per avere proprietà di *shear-thinning* e *self-healing*, si prediligono interazioni non covalenti.

Introducendo reticoli reversibili, l'interazione tra le molecole dei bioinchiostri è aumentata e la viscosità dei bioinchiostri può essere modificata senza regolare la concentrazione (Gu, et al., 2018; Hafeez, et al., 2018). La reticolazione reversibile spesso conferisce agli idrogel proprietà *shear-thinning* e *self healing* essenziali per i bioinchiostri. Tra i metodi di reticolazione reversibili, i metodi di reticolazione non covalente, mostrano una rapida formazione e rottura del legame. Così, la formazione, la distruzione e il recupero di idrogeli aventi reticoli non covalenti sono efficienti e corrispondono con il processo di stampa 3D. Inoltre, la reticolazione non covalente può formarsi in modo efficiente senza l'aggiunta di agenti di reticolazione esogeni, riducendo così il rischio di contaminazione chimica e di tossicità. Idrogeli reticolati non covalentemente possono creare ambienti adatti per il caricamento di cellule, proteine e altri agenti biologici. Allo stesso tempo, questa reticolazione è di solito reversibile; il legame si rompe sotto l'azione della forza esterna e poi si ricombina sotto l'azione della forza intermolecolare (dopo la rimozione della forza esterna)

rendendo il materiale pseudoplastico e soddisfacendo così i requisiti di processabilità di un bioinchiostro per la stampa ad estrusione.

1.5.4 Legami covalenti dinamici

In campo biomedico gli idrogeli con proprietà *self-healing* hanno riscontrato molto successo considerato che possono presentare proprietà meccaniche robuste, pseudoplastiche o adattabili alle cellule per un'ampia gamma di applicazioni, come stampa 3D per il rilascio di farmaci e/o *cell delivery* in quanto presentano una struttura dinamica che permette agli idrogeli di autoripararsi e riarrangiarsi in altre forme (Dong, et al., 2016; Park, et al., 2007). Inoltre, molti idrogeli dinamici sono sensibili a stimoli esterni, come alta temperatura, basso pH e luce (Mouser, et al., 2017). Gli idrogeli *self-healing* si sono rivelati idonei nell'utilizzo di *bioinks* nella stampa 3D grazie alle caratteristiche autosupportanti che consentono una deposizione a strato con formazione di strutture stabili.

Gli idrogeli che presentano proprietà *shear-thinning* e *self-healing* consentono un incapsulamento omogeneo di piccole molecole (Bakker, et al., 2018; Yavvari, et al., 2017), proteine (Bastings, et al., 2014; Purcell, et al., 2014) e geni (Wang & Burdick, 2017), così da potere essere utilizzati per avere un rilascio controllato o per applicazioni locoregionali mediante iniezione. Infatti, questi tipi di idrogeli, consentono una somministrazione localizzata così da avere maggiore biodisponibilità riducendo al minimo gli effetti collaterali. Per quanto riguarda le applicazioni iniettabili, questi *scaffolds* si sono rivelati efficienti vettori cellulari, consentendo il riempimento di cavità presenti e ripristinando i tessuti danneggiati (Overstreet, et al., 2012). Inoltre, gli idrogeli *self-healing* non formano crepe, così da prolungare la loro durata d'impianto nel tessuto ingegnerizzato (Wei, et al., 2014).

Tra questi tipi di interazioni fanno parte le basi di Schiff, le interazioni generate dalle ossime, i legami disolfuro e legami Diels–Alder reversibili, ampiamente utilizzati in applicazioni biomediche come reticolanti per la formazione di idrogeli con proprietà *self-healing* (Liu & Hsu, 2018).

La biocompatibilità del legame ossimico, formato attraverso la condensazione dell'idrossilammina con un chetone o un'aldeide, è stata dimostrata mediante incapsulamento di cellule staminali *in vitro* (Grover, et al., 2012). Inoltre questo legame migliora la stabilità degli idrazoni e delle immine (Kalia & Raines, 2008; Mukherjee, et al., 2015).

I legami disolfuro, formati dalla reazione di due gruppi tiolici, giocano un ruolo chiave nel *folding* and *assembly* delle proteine (Kirchhof, et al., 2013). Per la formazione di idrogeli, mediante questa interazione, è richiesta la presenza di un agente ossidante; tuttavia, l'ossigeno stesso è sufficiente per guidare la reticolazione (Sun & Huang, 2016). In questo modo, i legami disolfuro possono essere rotti o riformati mediante riduzione/ossidazione e/o mediante reazioni di scambio tiolo-disolfuro.

Un altro gruppo di idrogeli con proprietà *self-healing* ottenuti tramite legami covalenti dinamici, sono quelli derivanti dalla reazione di Diels-Alder (Liu & Chuo, 2013). Tuttavia, le applicazioni biomediche di questa reazione sono limitate perché i legami Diels-Alder richiedono una temperatura elevata e tempi lunghi per ottenere prodotti con proprietà *self-healing*. Recentemente, la chimica Diels-Alder è stata combinata con altre interazioni reversibili, come interazione elettrostatica (Banerjee & Singha, 2017), legame di coordinazione (Li, et al., 2018a), legami imminici (Li, et al., 2018b) e legame acilidrazone (Yu, et al., 2015) (Figura 21).

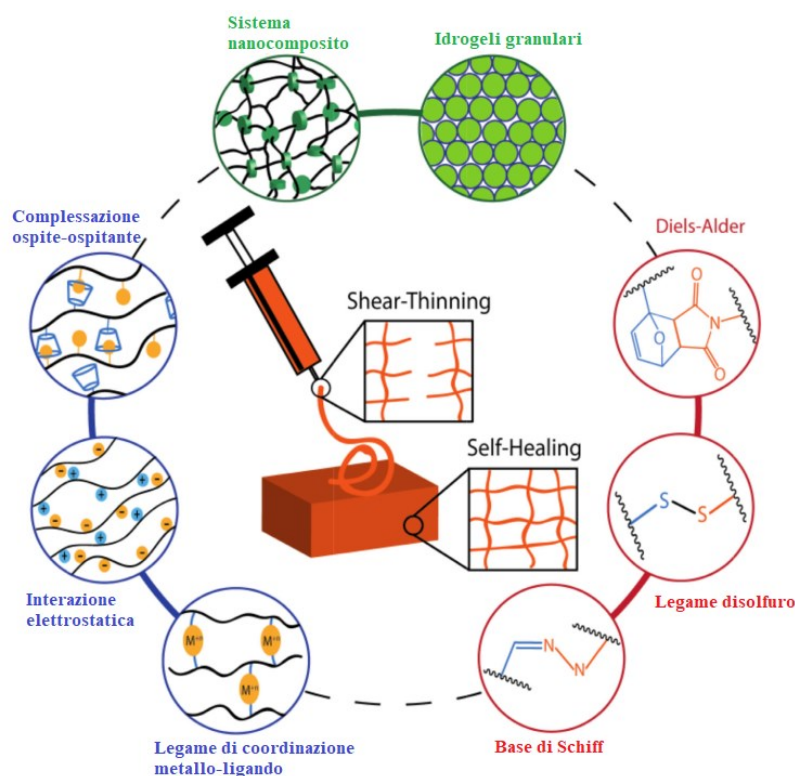


Figura 21. Tipi di interazioni dinamiche e reversibili negli idrogeli shear-thinning e self-healing (Uman, et al., 2020)

Una serie di idrogeli con proprietà *self-healing* sono stati prodotti tramite formazioni di basi alifatiche (Lü, et al., 2015) o basi aromatiche di Schiff (Karimi & Khodadadi, 2016). Queste ultime mostrano una maggiore stabilità nel mantenere le proprietà

meccaniche rispetto a quelle alifatiche (Zhang, et al., 2011). La base di Schiff, anche indicata immina, è un composto con un doppio legame carbonio-azoto formato dall'attacco nucleofilo dell'ammina all'aldeide o chetone (Figura 22) (Pandit, et al., 2019).

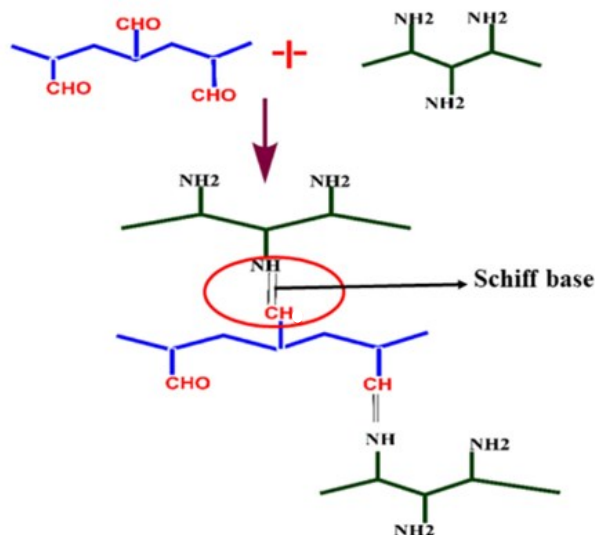


Figura 22. Rappresentazione schematica della reticolazione covalente di HA-aldeide con molecole contenenti gruppi amminici con formazione del legame imminico (Pandit, et al., 2019)

Le reazioni che portano alla formazione della base di Schiff sono state ampiamente utilizzate per l'incapsulamento cellulare (Yang, et al., 2012), la riparazione dei tessuti (Mohan, et al., 2017), la somministrazione di farmaci (Huang, et al., 2019; Qu, et al., 2017) e la medicazione di ferite (Qu, et al., 2018; Zhao, et al., 2017b). L'HA, il destrano (Tan & Hu, 2012), il condroitin solfato (Zhao, et al., 2017b), l'alcool polivinilico (Wang, et al., 2004), altri derivati del chitosano (Khan, et al., 2018) e recentemente la vanillina (4-idrossi- 3-metossibenzaldeide) (Cao, et al., 2021), sono stati ampiamente utilizzati per la preparazione di idrogeli tramite formazione di una base di Schiff. Per via dell'equilibrio dinamico intrinseco tra l'aldeide e i reagenti amminici, le interazioni possono essere considerate pseudocovalenti. Inoltre, questi idrogeli sono in grado di proteggere le cellule durante l'estrusione attraverso un ago, aprendo la strada alle applicazioni di stampa 3D (Huang, et al., 2016).

La formazione di un idrogel per mezzo di legami tra gruppi aldeidici e gruppi amminici presenti in alcuni polimeri come gelatina e chitosano è stata ampiamente studiata per varie applicazioni in ingegneria tissutale.

Nair e coll. (Nair, et al., 2011) hanno riportato idrogel a base di chitosano e HA-aldeide aventi proprietà di gelificazione rapida indipendenti dalla temperatura. È stato riportato che la stabilità dell'idrogel è dovuta alla formazione di legami covalenti tra gruppo aldeidico dell'HA-aldeide e il gruppo amminico del chitosano. Questi idrogeli sono risultati biocompatibili avendo la capacità di trattenere più del 95% di cellule incapsulate, risultando buoni candidati per l'ingegneria tissutale. Inoltre, gli autori hanno anche proposto che tali idrogeli potessero trovare una potenziale applicazione nel *gene delivery*.

Hozumi e coll. (Hozumi, et al., 2018) hanno studiato idrogeli iniettabili a base di gelatina carboidrazide (Gel-CDH) e HA-aldeide (HA-CHO) (Figura 23).

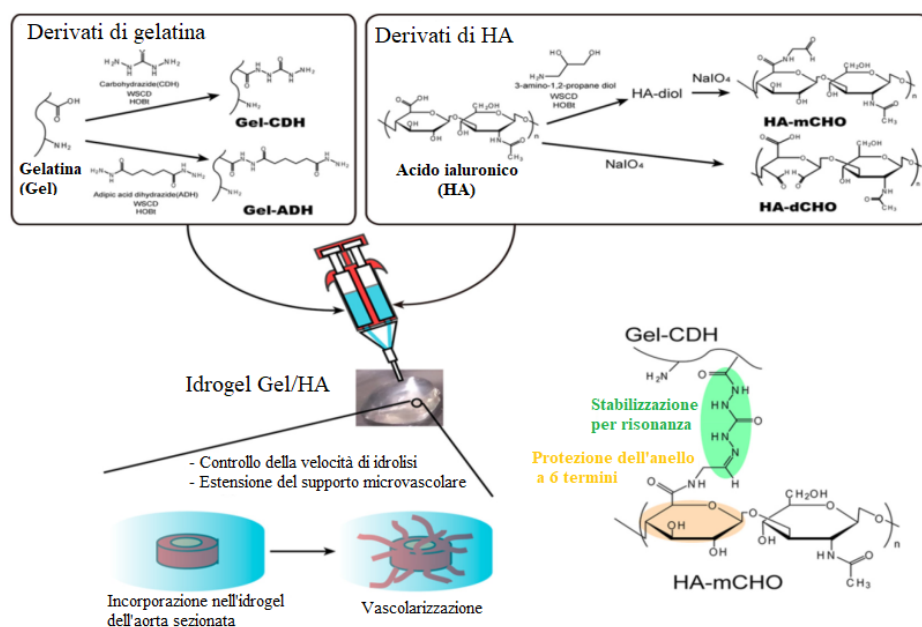


Figura 23. Fabbricazione di scaffolds a base di idrogeli Gel-CDH/HA-CHO (Hozumi, et al., 2018)

Questi idrogeli sono stati prodotti tramite reticolazione tra la carboidrazide e i gruppi aldeidici con formazione della base di Schiff. L'idrogel Gel-CDH/HA-aldeide sintetizzato ha mostrato una lenta degradazione idrolitica rispetto ad altri idrogeli a base di gelatina e HA rendendolo adatto, come *scaffold*, per la formazione di nuovi vasi sanguigni. Inoltre, studi *ex vivo* nell'anello aortico di ratto, hanno dimostrato l'effetto della concentrazione dell'idrogel sull'estensione microvascolare, ampliandone il suo utilizzo nel campo dell'ingegneria tissutale.

You e coll. (You, et al., 2018) hanno sviluppato uno *scaffold* per TE osteocondrale a doppio strato composto da una doppia rete di idrogel ottenuto tramite polimerizzazione di radicali liberi. Questo meccanismo coinvolge la reazione tra poli(etilenglicole) diacrilato e N-carbossietil chitosano con HA-aldeide, attraverso la formazione della base di Schiff. Tramite studi SEM, meccanici e macroscopici è stato osservato che lo *scaffold* fabbricato mostra proprietà *self-healing*. Inoltre, questo idrogel ha anche mostrato una buona biocompatibilità, confermata sia *in vitro* che *in vivo*.

1.5.5 HA-aldeide (HA-Ald) e vantaggi del suo uso come reticolante

La formazione di idrogel tramite base di Schiff, che coinvolge l'HA-aldeide, può verificarsi in soluzione acquosa senza l'uso di catalizzatori o prodotti chimici esterni. Pertanto, tale tipo di reazione è considerata come uno dei metodi più facili per la formazione di idrogel *in situ*.

Per l'ossidazione dell'HA l'utilizzo del periodato di sodio (NaIO_4) come agente ossidante, risulta essere uno dei metodi più utilizzati di modifica del gruppo ossidrilico (Figura 24).

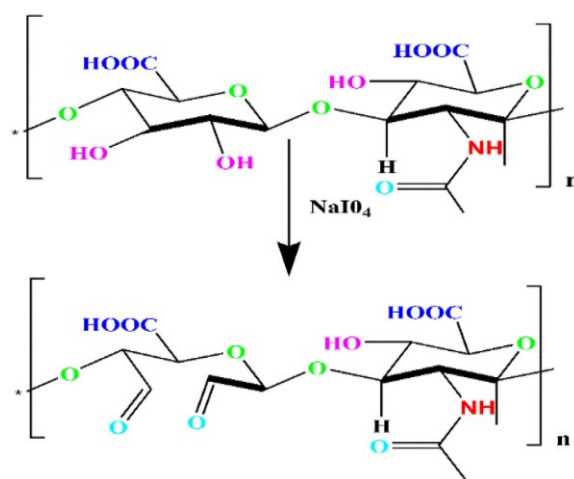


Figura 24. Rappresentazione schematica dell'ossidazione dell'HA con l'utilizzo del periodato di sodio (Pandit, et al., 2019)

Esso ossida i gruppi ossidrilici vicinali presenti nel secondo e terzo atomo di carbonio (C-2 e C-3) delle unità ripetitive della catena di HA. Questo fenomeno causa la rottura dei legami C-C, portando alla formazione di due gruppi aldeidici nei carboni ossidati delle unità di zucchero monomeriche. Il periodato può anche reagire con i gruppi ossidrilici adiacenti rimanenti, portando alla formazione di emiacetali ciclici. L'HA modificato con periodato, possiede gruppi dialdeidici altamente reattivi che sono in

grado, tramite accoppiamento riduttivo, di reagire con ammine primarie (Elahipanah, et al., 2017). Tuttavia, il trattamento ossidativo provoca la rottura delle catene con la formazione di legami potenzialmente immunogenici nel biomateriale.

Una delle principali limitazioni, riscontrata nella maggior parte degli *scaffolds*, utilizzati nella rigenerazione dei tessuti, è il loro impianto chirurgico. Nell'ingegneria dei tessuti, l'applicazione di idrogeli a base di HA che reticolano dopo l'iniezione risulta molto vantaggiosa, poiché l'HA iniettabile può riempire i difetti di qualsiasi forma e può reticolare *in situ*. Inoltre, i metodi di iniezione possono ridurre l'uso di tecniche chirurgiche invasive (Fakhari & Berklund, 2013).

Recentemente, vari ricercatori hanno utilizzato la strategia di gelificazione *in situ* utilizzando HA-aldeide come reticolante nella sintesi di idrogeli compositi, senza il coinvolgimento di alcun reticolante esterno per l'applicazione in ingegneria tissutale. Ad esempio, Li e coll. (Li, et al., 2014) hanno prodotto un idrogel iniettabile reticolato *in situ* a base di HA-aldeide sintetizzato con N, O-carbossimetil chitosano (NOCC) per la prevenzione dell'adesione post-operatoria. Questo idrogel ha mostrato citotossicità trascurabile e inibizione dell'adesività cellulare sulla sua superficie, prevenendo l'adesione peritoneale post-chirurgica.

Allo stesso modo, Deng e coll. (Deng, et al., 2017) hanno sintetizzato idrogeli che coinvolgono HA-aldeide e NOCC per la rigenerazione del tessuto addominale. Questi idrogeli hanno permesso la guarigione della parete addominale, promuovendo la crescita dell'ECM e consentendo anche la proliferazione cellulare.

Uno dei principali limiti dell'ossidazione dell'HA è la degradazione della catena polisaccaridica, con conseguente formazione di HA con pesi molecolari più bassi (diminuzione del peso molecolare dell'HA che passa da 1,3 MDa a 260 kDa (Schanté, et al., 2011). A causa dell'ossidazione, le catene polimeriche diventano più suscettibili alle reazioni di β -eliminazione perfino in ambiente fisiologico normale. L'apertura dell'anello provoca anche la compattazione della struttura a causa della grande flessibilità della catena dei prodotti ossidati.

L'HA nativo presenta una struttura rigida, che porta spesso all'ottenimento di idrogeli fragili. L'apertura dell'anello dovuta al processo ossidativo, risolve il problema della rigidità della catena, migliorando le proprietà elastiche degli idrogeli a base di HA (Weng, et al., 2008).

È necessario menzionare che gli idrogeli composti da polisaccaridi ossidati e altri biopolimeri devono essere citocompatibili. Pertanto, è importante valutare la sicurezza

dei biomateriali prima del loro utilizzo clinico. Le funzionalità aldeidiche sono altamente reattive in quanto possiedono la tendenza a reagire con biopolimeri ricchi di elettroni, inducendo così citotossicità (Nguyen & Lee, 2011). Dopo l'ossidazione, l'HA-aldeide può essere impiegato per la reticolazione con un gruppo amminico presente nei biopolimeri. La reticolazione dei gruppi aldeidici dell'HA-aldeide con gruppi amminici di altri biopolimeri può aumentare la sua biocompatibilità superando il problema.

1.5.6 Applicazione dell'HA: tessuto osseo e cartilagineo

Il successo dell'ingegneria del tessuto osseo dipende in gran parte dal materiale dello *scaffold*, dalla resistenza meccanica e dal grado di porosità, fondamentale per una corretta crescita e migrazione delle cellule, per il flusso di nutrienti e per la vascolarizzazione (De Witte, et al., 2018). Ci sono molti fattori coinvolti, quali cellule, matrice tridimensionale e molecole di segnalazione ricombinanti (Sabir, et al., 2009). Tutti questi fattori giocano un ruolo importante nella rigenerazione dei tessuti e nel processo di guarigione. Per esempio, gli *scaffolds* per l'ingegneria delle ossa vengono scelti accuratamente affinché imitino la struttura, le proprietà meccaniche e biologiche dell'osso naturale (Fang, et al., 2016; Langer, 2000). Idrogeli basati su HA-aldeide presentano alcuni vantaggi, in quanto consentono l'incapsulazione di cellule, facilitano la loro proliferazione e promuovono, controllando la diffusione di fattori osteoinduttivi, il *signaling* intra ed intracellulare.

Martínez-Sanz e coll. (Martínez-Sanz, et al., 2011) hanno sviluppato idrogeli reticolati chimicamente di HA-aldeide e HA modificato con idrazide. Gli idrogeli, che sono risultati essere non citotossici, sono stati utilizzati per il rilascio controllato di proteine morfogenetiche. In particolare, l'idrogel caricato con proteine ossee e iniettato nel calvarium di ratto, ha indotto la formazione ossea in 8 settimane. Dagli studi istologici, il nuovo osso formato ha evidenziato la presenza di una maggiore quantità di proteine ossee come osteocalcina ed osteopontina con midollo osseo angiogenico.

L'ingegneria dei tessuti cartilaginei mira, invece, a rigenerare la cartilagine che è frequentemente esposta a traumi, malattie congenite ed invecchiamento (Akaraonye, et al., 2016).

Poiché la cartilagine non è vascolarizzata, è necessario sviluppare approcci terapeutici che forniscano cellule adatte, biomateriali e fattori condroistruttivi direttamente al sito danneggiato. L'HA è il componente principale della cartilagine articolare che aiuta

nella lubrificazione del liquido sinoviale e costituisce la parte centrale degli aggregati di proteoglicani all'interno della matrice extracellulare della cartilagine. Proprio per queste ragioni, gli *scaffolds* basati sull'HA risultano idonei per applicazioni di rigenerazione cartilaginea (Pandit, et al., 2019).

È stato osservato, da studi *in vitro*, che la presenza di HA in *scaffolds* tridimensionali è responsabile della creazione di un ambiente condroinduttivo che promuove la sintesi di ECM durante la rigenerazione della cartilagine *in vivo* (Chen, et al., 2014; Wu, et al., 2010).

È stato scoperto che gli idrogeli a base di HA-aldeide, promuovono la rigenerazione della cartilagine. V Thomas e coll. (V Thomas, et al., 2017) hanno fabbricato un idrogel iniettabile a due componenti a base di chitosano (CH) e HA-aldeide e ne hanno studiato l'effetto, attenzionando la crescita e la funzionalità dei condrociti incapsulati. In particolare, sono stati preparati degli idrogeli con tre diversi rapporti CH/HA. È stata valutata la rigidità degli idrogeli utilizzando la spettroscopia AFM. I risultati ottenuti hanno rivelato che l'elasticità dell'idrogel può essere modificata variando la composizione dell'HA-aldeide, cambiando così il grado di reticolazione e la rigidità. Inoltre, sono stati coltivati, per circa 28 giorni, i condrociti all'interno di questi idrogeli con rigidità variabile. Si è visto che gli idrogeli rigidi hanno contribuito a mantenere il fenotipo sferico e hanno consentito una distribuzione uniforme delle cellule, con formazione di aggregati sferici. Tuttavia, gli idrogeli con la minore rigidità, mostrano una buona vitalità cellulare nei primi 7 giorni di coltura. Inoltre, è stata riscontrata maggiore espressione della produzione di ECM (collagene di tipo II e GAG) nel *gel* più rigido. Questi risultati suggeriscono che la rigidità o l'elasticità degli idrogeli possono essere opportunamente modificate per ottenere caratteristiche più simili a quelle dell'ECM nativa, al fine di progettare un microambiente *in vitro* ottimale per la rigenerazione della cartilagine

1.6 Ulteriori strategie per migliorare la stabilità post-stampa

Dopo il processo di stampa, i dispositivi stampati sono di solito sottoposti a coltura *in vitro* o impianto *in vivo*. Pertanto, anche la stabilità a lungo termine è una questione importante. I bioinchiostri pre-reticolati si basano su una strategia di crosslinking, che di solito coinvolge più di due passaggi. La prima fase di reticolazione migliora le

proprietà reologiche del bioinchiostro, mentre la seconda fase di reticolazione garantisce la stabilità a lungo termine del bioinchiostro in condizioni fisiologiche. Un esempio di *pre-crosslinking* è il polietilenglicole lineare e ramificato modificato con ammina (PEGX) come agente di reticolazione, che collega le catene di gelatina e con quelle di fibrina attraverso la reazione tra il gruppo amminico e il gruppo acido per migliorare le proprietà reologiche. La seconda fase della reticolazione consiste nel stabilizzare il reticolo mediante reticolazione della fibrina con trombina o della gelatina con EDC/NHS (Rutz, et al., 2015). La prima fase di reticolazione utilizza un agente di reticolazione a catena lunga per garantire che le cellule abbiano spazio sufficiente e permette anche di estrarre il bioinchiostro reticolato attraverso l'ugello di iniezione. Il gruppo X in PEGX può essere un gruppo contenente un'ammina, che può essere accoppiato e reticolato con macromolecole come gelatina e fibrina, o può essere un gruppo acrilato, un gruppo maleimidico o un gruppo vinilsolfonico che può reagire con con gruppi tiolici di polimeri mediante *click chemistry* o addizione di Michael (Zhu, 2010).

1.7 Modificazione chimica

Poiché attualmente non esiste un bioinchiostro perfetto, la funzionalizzazione di un materiale (polimero) di partenza, è un modo pratico per superare le limitazioni e ottenere le proprietà desiderate. Tuttavia, è importante notare che le caratteristiche del materiale e del costrutto prodotto dipendono in modo significativo dal risultato desiderato (cioè, il tessuto o l'organo bersaglio). A causa della complessità del corpo umano, esiste un'immensa variabilità tra i diversi tessuti e organi per quanto riguarda le loro esigenze strutturali e fisiologiche (Ligon, et al., 2017) e, in quanto tale, le funzionalizzazioni dipendono da queste esigenze e devono essere adattate secondo necessità.

Nella ricerca di ottenere le proprietà desiderabili nel polimero per la stampa 3D, la funzionalizzazione chimica è stata esplorata in numerosi modi e uno di questi metodi è l'introduzione di gruppi metacrilati. La funzionalizzazione di polimeri [come la gelatina, l'acido ialuronico e il poli(idrossimetilglicolide-co-ε-caprolattone)] con gruppi di metacrilato insaturi (Derakhshanfar, et al., 2018) produce polimeri fotopolimerizzabili e forma una struttura più stabile meccanicamente. È stato dimostrato che un aumento del grado di metacrilazione (Mandrycky, et al., 2016) incrementa la rigidità dei costrutti se misurata su vari livelli di tensione; tuttavia, il

modulo di compressione è influenzato principalmente dalla concentrazione del polimero metacrilato. Le proprietà meccaniche sono inoltre influenzate dall'innesto covalente di una rete termoplastica di rinforzo in un idrogel (Murphy & Atala, 2014). Inoltre, i materiali sono stati modificati chimicamente con lo scopo di incoraggiare la bioattività. Ad esempio, l'alginato, considerato bioinerte, una volta modificato mediante l'introduzione di gruppi contenenti zolfo, ha permesso il legame dei fattori di crescita e ha anche aumentato la proliferazione cellulare (Shi, et al., 2017). È stato anche dimostrato che il solfato di alginato possiede un'attività mitogenica che presenta una proliferazione cellulare superiore (Skardal & Atala, 2014). Inoltre, la modifica chimica dell'alginato e di altri polimeri naturali con peptidi (ad esempio, RGD) è una strategia ampiamente usata per fornire i siti per l'adesione delle cellule. Ad esempio, Jia e coll. (Jia, et al., 2014) hanno prodotto costrutti di alginato modificato con RGD (RGD-alginato) mediante *3D bioprinting* caricati con human Adipose-Derived Stem Cells (hADSCs). Le hADSCs mostravano morfologie allungate nelle matrici di RGD-alginato, mentre mostravano morfologie rotonde in quelle di alginato anche dopo 8 giorni di incubazione.

Per concludere, questi nuovi metodi di progettazione permettono di evadere dalle limitazioni dei materiali esistenti, migliorando le loro prestazioni, ampliando le idee di progettazione dei bioinchiostri e promuovendo notevolmente lo sviluppo in questo campo.

1.8 Classificazione funzionale dei *bioinks*

Considerato l'elevato contenuto di acqua degli idrogeli, i costrutti biostampati per estrusione sono tipicamente *soft* e per ottenere strutture tridimensionali stabili capaci di sostenere ciascuno strato, spesso vengono usati diversi meccanismi di gelificazione/reticolazione come descritto sopra.

Nonostante questi meccanismi migliorino significativamente la stabilità della struttura desiderata, in assenza di un rinforzo meccanico, questi costrutti, sono limitati alle sole applicazioni di tessuti molli (Sears, et al., 2016).

Per ottenere scaffold 3D in grado di mimare tessuti meccanicamente resistenti, quali l'osso e la cartilagine, sono stati ampiamente impiegati polimeri termoplastici, da soli o in combinazione con bioinchiostri tradizionali con la funzione di struttura di supporto (Park, et al., 2016c; Lee, et al., 2017).

Un costrutto può essere costituito da molti *bioinks* diversi che svolgono tutti un ruolo nello sviluppo di un tessuto funzionale. Sulla base del loro ruolo finale in un costrutto 3D bioprinted, i *bioinks* possono, anche, essere classificati in *bioink* di supporto, sacrificali, strutturali e funzionali (Tabella 1) (Prendergast, et al., 2016) in quanto possono impartire funzionalità biologica, servire come materiale sacrificale o supportare e fornire rigidità a costrutti complessi.

Tabella 1. Caratteristiche ed esempi dei diversi tipi di *bioinks* (Williams, et al., 2018)

Materiali	Caratteristiche	Esempi
Strutturali	<ul style="list-style-type: none"> • Supporto all'adesione cellulare • Mantengono fedelmente la forma prima e dopo la stampa • Cross-linkabili sia attraverso interazioni covalenti che ioniche • Resistente alla dissoluzione in condizioni di coltura cellulare 	<ul style="list-style-type: none"> • Alginato • Gelatina • Collagene • Chitosano • Seta • Cellulosa nanofibrillare
Funzionali	<ul style="list-style-type: none"> • Possiedono gruppi che legano reversibilmente fattori di crescita e morfogeni • Contengono fattori di crescita o morfogeni legati in modo covalente o legati • Possiedono peptidi di adesione specifici delle cellule o sequenze di degradazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Acido ialuronico • GAGs • Eparina • Cheratina • Gelatina
Sacrificali	<ul style="list-style-type: none"> • Solubili in condizioni miti • Sottoprodotti non tossici • Mantengono la stabilità della forma fino al raggiungimento delle condizioni di dissoluzione 	<ul style="list-style-type: none"> • Pluronic • Alginato • Agarosio
Non Biologici	<ul style="list-style-type: none"> • Meccanicamente robusti • Resistenti ai carichi • Sostengono strutture più morbide 	<ul style="list-style-type: none"> • PCL • PLGA • Poliuretani

La biostampa ad estrusione, grazie alla possibilità di una stampa ibrida, si configura dunque come la tecnica più promettente per creare organi e tessuti paragonabili a quelle dei loro omologhi *in vivo* e quindi per la traslazione in clinica (Derby, 2012; Ferris, et al., 2013a).

Nonostante spesso la definizione di *bioink* si riferisca ad una dispersione cellulare eventualmente supplementata con molecole biotattive o biomateriali di supporto, spesso vengono così chiamati anche quei biomateriali che sono estrusi ma che non hanno incapsulato cellule al loro interno sia per motivi di parametri della stampa, come temperatura o solventi organici, tipici del processo e della tecnica selezionata sia perchè il materiale stampato non sempre ha lo scopo di veicolare cellule. I ***bioinks di supporto*** (non-biologici) svolgono la funzione di supporto, offrono un sostegno per le popolazioni cellulari durante la stampa e garantiscono robustezza e stabilità meccanica. In particolare, migliorano le proprietà meccaniche e la struttura dei costrutti. Questi materiali sono utilizzati principalmente quando vengono biostampati tessuti che richiedono una maggiore resistenza meccanica, come ossa e cartilagine

(Prendergast, et al., 2016); i *bioinks fuggitivi* o *sacrificali*, offrono un supporto temporaneo e possono essere utilizzati per ottenere geometrie complesse in quanto possono essere rimossi rapidamente dopo la stampa per formare pori interni o canali nel costrutto stampato; i *bioinks strutturali* hanno il compito di proteggere le cellule dalle sollecitazioni di taglio durante il processo di stampa, imitare la matrice extracellulare, gelificare rapidamente ed essere biocompatibili. Sono usati per fornire integrità meccanica, per mantenere la forma dopo la stampa e garantire l'adesione cellulare alle strutture stampate, possono anche essere sacrificali ma su un lasso di tempo relativamente lungo e, infine, i *bioinks funzionali* forniscono segnali biochimici, meccanici o elettrici per influenzare il comportamento cellulare dopo che una struttura è stata stampata.

Alcuni biomateriali come PCL, PLGA e poliuretani possono essere meglio descritti come “*inks* di supporto non biologici” a causa della loro origine sintetica e dell'incompatibilità con le cellule, ma possono essere importanti nel fornire supporto strutturale a costrutti stampati con geometrie complesse. Inoltre, possono proteggere una struttura stampata da carichi elevati durante il processo di sviluppo, durante l'integrazione in sistemi bioreattori o dopo l'impianto in regioni del corpo ad alto carico. Tra questi biomateriali, in questa tesi, particolare attenzione sarà rivolta ai poliuretani.

1.9 Poliuretani

I poliuretani (PU), macromolecole contenenti legami uretanici [R-NH-CO-O-R'], descritti per la prima volta nel lavoro di Otto Bayer del 1947 (Bayer, 1947), sono stati impiegati per la produzione di *scaffolds* per l'ingegneria dei tessuti, progettati per andare incontro a biodegradazione con l'obiettivo di rigenerare un tessuto sano e funzionale; ma non solo, negli ultimi anni sono stati studiati poliuretani biodegradabili per la realizzazione di *scaffolds* e sistemi per il *drug delivery*. L'entrata in scena di questi polimeri deriva dalla possibilità di utilizzare idonei reagenti per ottenere prodotti con capacità e proprietà meccaniche, chimiche ed elastiche idonee allo scopo a cui sono destinati (Francolini, et al., 2012), anche a scopi biomedicali.

Si tratta di polimeri di sintesi ottenuti dalla reazione chimica di poliaddizione tra diisocianati e polioli, come mostrato in Figura 25 (Przybytek, et al., 2018), in presenza di idonei catalizzatori.

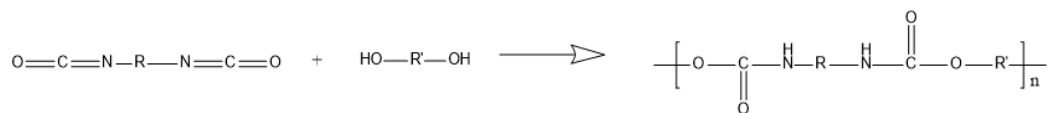


Figura 25. Reazione di sintesi del legame carbammico tra diisocianato e alcool (Przybytek, et al., 2018)

La reazione di sintesi necessita, dunque, della presenza di questi tre substrati fondamentali, il poliolo costituirà quella che contribuirà alla formazione della porzione *soft*, in quanto conferisce al polimero proprietà elastiche; il di-isocianato invece contribuirà alla formazione della porzione *hard* ed infine l'estensore di catena, fondamentale per l'allungamento della catena polimerica, che, insieme al di-isocianato, sarà responsabile della resistenza meccanica del polimero finale (Caracciolo, et al., 2009; Ping, et al., 2007).

In particolare, gli isocianati utilizzati si distinguono in alifatici, cicloalifatici, diciticloalifatici, policiclici o aromatici; nelle loro molecole hanno il caratteristico gruppo $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ (NCO), dove il carattere positivo dell'atomo di carbonio determina la reattività dell'isocianato, in quanto attrae i nucleofili; mentre gli atomi di N e O attraggono gli elettrofili. Generalmente le reazioni che coinvolgono questo reagente consistono in una addizione sul doppio legame carbonio-azoto che è soggetto ad addizione nucleofila. Il centro nucleofilo di una molecola dotata di un "idrogeno attivo" attacca il carbonio positivo del gruppo -NCO e l'idrogeno, quindi, si addiziona all'atomo di azoto. Per tale motivo, sono molto reattivi verso i reagenti nucleofili come gli alcoli o le ammine per produrre un legame uretanico o ureico, rispettivamente. La reattività del doppio legame tra il carbonio e l'azoto dell'isocianato sarà maggiore in presenza di gruppi elettrone-attrattori mentre sarà ridotta da gruppi elettrone-donatori. Nell'attacco all'isocianato, gruppi elettrone-attrattori aumentano la reattività dell'isocianato, mentre gruppi elettrone-donatori la riducono. Per gli alcoli primari e secondari, la reazione non catalizzata procede rapidamente a temperature elevate (50-100 °C). Le reazioni con alcoli terziari e fenoli, d'altra parte, sono lente, quindi vengono frequentemente utilizzati catalizzatori, come ad esempio il dibutilstagno dilaurato (DBTDL) (Luo, et al., 1997).

Per il legame ureico, ammine alifatiche primarie e secondarie, come ammine aromatiche primarie, reagiscono rapidamente con gli isocianati a 0–25 °C.

I diisocianati aromatici sono più reattivi rispetto a quelli alifatici, a causa della delocalizzazione della carica negativa nell'anello aromatico (Lin, et al., 2014b) e sono impiegati per la produzione di PU rigidi con elevata resistenza meccanica. Nonostante alcuni diano origine a PU biocompatibili, sono comunque scarsamente utilizzati a scopo biomedicale a causa del possibile rilascio di residui tossici di degradazione (Gabriel, et al., 2014). Per questo motivo sono preferibili i diisocianati alifatici se il prodotto è destinato ad essere riassorbito (Barrioni, et al., 2015; Mondal & Martin, 2012).

Per quanto riguarda i polioli, questi svolgono un ruolo fondamentale nelle proprietà chimico-fisiche dei prodotti finali e in commercio sono più di 500 quelli disponibili. Possono essere poliesteri, polieteri, policarbonati o policaprolattoni.

Il tipo di poliolo utilizzato gioca un ruolo importante nelle proprietà chimico-fisico e meccaniche dei poliuretani, ad esempio, quelli a base di poliestere sono più sensibili alla scissione idrolitica rispetto a quelli a base di polietere. Tuttavia, l'introduzione di gruppi laterali alchilici in un poliestere a terminazione idrossilica, ad esempio poli (2, 4-dietil-1, 5-pentametilene adipato) produce poliuretani più stabili all'idrolisi (Kim & Kim, 2005). La corretta selezione permette di conferire ai PU maggiore o minore sensibilità all'acqua e stabilità all'idrolisi. Il processo di degradazione risulta "controllato" per quanto riguarda i polioli con struttura cristallina, mentre risulta essere "meno controllato" nei polioli con struttura amorfa (Ruiz, et al., 2014). In particolare, il processo di degradazione è favorito nei polioli a catena corta di carbonio e diisocianati alifatici.

Ad esempio i PU a base di ossido di polietilene mostrano capacità di assorbimento dell'acqua a causa dell'idrofilia, mentre quelli a base di ossido di polipropilene, più idrofobo, sono meno sensibili all'ambiente acquoso. Inoltre, i poliesteri, impiegati per la produzione di poliuretani dotati di ottima resistenza chimica, resistenza fisica a flessione e abrasione e buone proprietà elastomeriche, sono suscettibili a idrolisi. I polieteri sono utilizzati per ottenere poliuretani flessibili, sono più resistenti all'idrolisi rispetto ai poliesteri, ma subiscono ossidazione; mentre i policarbonati mostrano maggiore resistenza sia all'idrolisi che all'ossidazione e possiedono buona stabilità strutturale. I polioli più usati nel campo biomedicale sono il policaprolattone (PCL), il polietilenglicole (PEG) o il politetrametilenglicole (PTMG) in quanto sono idrolizzabili (Barrioni, et al., 2015) e danno origine a PU biocompatibili.

Anche il peso molecolare influenza le proprietà finali del PU ed in particolare per i polioli utilizzati a scopo biomedicale il peso molecolare è compreso tra 500 e 6000 g/mol. I polioli ad alto peso molecolare sono impiegati, ad esempio, per la produzione di PU flessibili (Joseph, et al., 2018; Lei, et al., 2017). I polioli possono essere a basso peso molecolare (PM nell'ordine dei 100 g/mol) o ad alto peso molecolare (PM nell'ordine degli 8000 g/mol). Per quanto riguarda i dioli, quelli a basso peso molecolare hanno la funzione di estensori di catena, cioè incrementano il peso molecolare delle catene polimeriche, invece quelli ad alto peso molecolare vengono definiti macrodioli.

I catalizzatori vengono impiegati per accelerare la velocità di sintesi dei poliuretani (Zia, et al., 2014). Molte tipologie di catalizzatori possono essere utilizzate grazie alla sensibilità del gruppo isocianato purché il catalizzatore sia un forte nucleofilo, tale da attaccare il carbonio dell'isocianato (Figura 26).

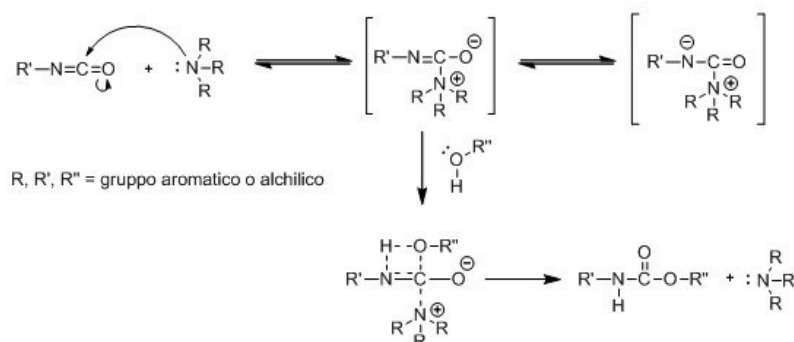


Figura 26. Meccanismo di azione dei catalizzatori amminici

I principali catalizzatori utilizzati sono ammine alifatiche terziarie e sali organici di stagno (Figura 27).

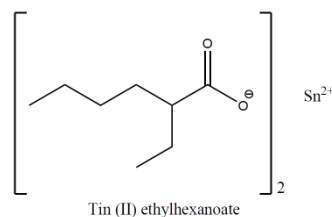


Figura 27. Struttura dello stannato di ottile utilizzato come catalizzatore

Tuttavia, le proprietà meccaniche dei *copolimeri tri-block*, ottenuti attraverso la polimerizzazione di isocianati e polioli, sono piuttosto scarse. Gli estensori di catena

influenzano le proprietà dei segmenti *hard* in quanto causano variazione della struttura chimica, della funzionalizzazione, del peso molecolare e della lunghezza della catena e il loro uso può produrre PU con distinta separazione in microfase tra i due segmenti termodinamicamente incompatibili: i segmenti *hard* e i segmenti *soft* (Przybytek, et al., 2018). La separazione in microfase, fornisce elasticità al poliuretano e determina le sue proprietà meccaniche, stabilità termica e resistenza idrolitica. Un contenuto di segmenti *hard* del 15-40% in peso risulta in PU elastomeri piuttosto morbidi e gommosi, mentre i poliuretani con un contenuto di segmenti *hard* del 40-65% in peso sono materiali elastomerici resistenti. Una rappresentazione del network della catena poliuretanicca è mostrata in Figura 28.

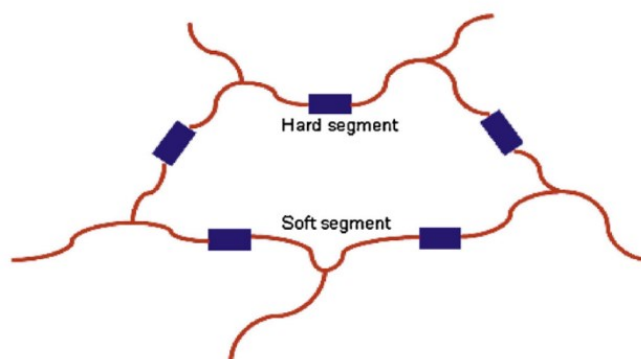


Figura 28. Separazione in microfase in un poliuretano: segmenti *hard* e *soft* (Przybytek, et al., 2018)

Come estensori di catena, normalmente, vengono utilizzate bisammine o dioli a basso peso molecolare come 1,4-butandiolo (BDO), 1,3-propandiolo (PDO), etilendiammina, glutatione ossidato e putrescina. Le proprietà fisiche e meccaniche dei poliuretani dipendono dall'entità della separazione di fase che, a sua volta, è determinata dal peso molecolare e dal tipo di dioli, nonché dal tipo e dal numero di estensori di catena utilizzati per polimerizzazione (Zhang, et al., 2008).

Per concludere, la scelta e la determinazione dei rapporti specifici dei tre componenti iniziali permette di diversificare e modificare le proprietà e le attività biologiche dei polimeri finali. Le proprietà fisiche e chimiche di questa categoria di macromolecole possono essere facilmente adattate per ricercare caratteristiche particolari grazie alla grande disponibilità di elementi costitutivi che possono essere incorporati. La categoria è dunque molto vasta e a questa appartengono diversi materiali con

caratteristiche anche molto differenti permettendo il loro utilizzo in diversi settori. Per questi motivi, sono ampiamente utilizzati nell'industria, ad esempio come adesivi, rivestimenti, pelle sintetica, nonché come materiali da costruzione e persino come ritardanti di fiamma (Gao, et al., 2011). A seconda della loro struttura e composizione, possono presentarsi in forma *lineare*, i cosiddetti poliuretani termoplastici; *reticolata*, generalmente i cosiddetti poliuretani termoindurenti oppure *espansa*, ovvero le schiume rigide o flessibili.

Anche il grado di reticolazione e di funzionalizzazione dei poliuretani interferisce con la reattività dei polimeri, influenzando direttamente le proprietà termiche e meccaniche.

Nella grande categoria dei poliuretani, quelli *lineari* sono tra i materiali maggiormente biocompatibili, adatti principalmente per impianti *in vivo* e a lungo termine. Possiedono proprietà chimiche, meccaniche e termiche personalizzabili grazie al loro peculiare rapporto struttura-proprietà. Mostrano riproducibilità, elasticità, bassa citotossicità, alta permeabilità all'ossigeno, alta trombo-resistività, bassa tensione interfacciale, alta biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà meccaniche paragonabili ai tessuti naturali e proprietà non immunogeniche (Janik & Marzec, 2015; Khan & Tanaka, 2018; Kucinska-Lipka, et al., 2015; Usman, et al., 2016).

Pertanto sono ampiamente utilizzati in applicazioni biomediche e farmaceutiche come materiali per medicazioni, sistemi di *drug delivery*, incorporazione di proteine nelle cellule e, soprattutto, come *scaffolds* per la rigenerazione di tessuti molli e duri (Bercea, et al., 2019; Gabriel, et al., 2017).

Negli ultimi decenni, le proprietà degli *scaffolds* bioattivi in PU sono state migliorate mediante l'incorporazione di prodotti biodegradabili (Zhang, et al., 2016), elettroattivi (Li, et al., 2019), funzionalizzati in superficie (Kara, et al., 2014), ceramiche (Fathi-Achachelouei, et al., 2019), vetri (Covarrubias, et al., 2019), fattori di crescita (Reyes, et al., 2014), metalli (Tamayo, et al., 2018) e polimeri naturali (Unnithan, et al., 2014), con conseguente formazione di poliuretani modificati (MPU). Pertanto, PU e MPU sono considerati come i biomateriali di grado medico ad alte prestazioni nell'ingegneria tissutale.

I PU che contengono segmenti di poli-caprolattone degradabili, sono spesso utilizzati come impianti per la rigenerazione tissutale e come sistemi per ottenere il rilascio controllato di farmaci (*Drug Delivery Systems-DDS*) (Sun, et al., 2011).

Possono, inoltre, essere progettati per essere termoreattivi (Loh, et al., 2008; Park, et al., 2006; Travinskaya & Savelyev, 2016) e anche per trasportare cariche positive (Wang, et al., 2008b).

Inoltre, negli ultimi anni, sono stati anche utilizzati in dispositivi biomedicali grazie alla loro biocompatibilità e flessibilità meccanica (Guelcher, et al., 2008) suscitando un'attenzione significativa come *scaffolds* nell'ingegneria tissutale.

Allo stesso modo, le proprietà degli *scaffold* di poliuretani come la flessibilità o rigidità, degradabilità o non degradabilità, idrofilia o idrofobicità e reticolazione chimica possono essere controllate a seconda delle esigenze (Bercea, et al., 2019; Marzec, et al., 2017; Wolf, et al., 2015; Zieleniewska, et al., 2014).

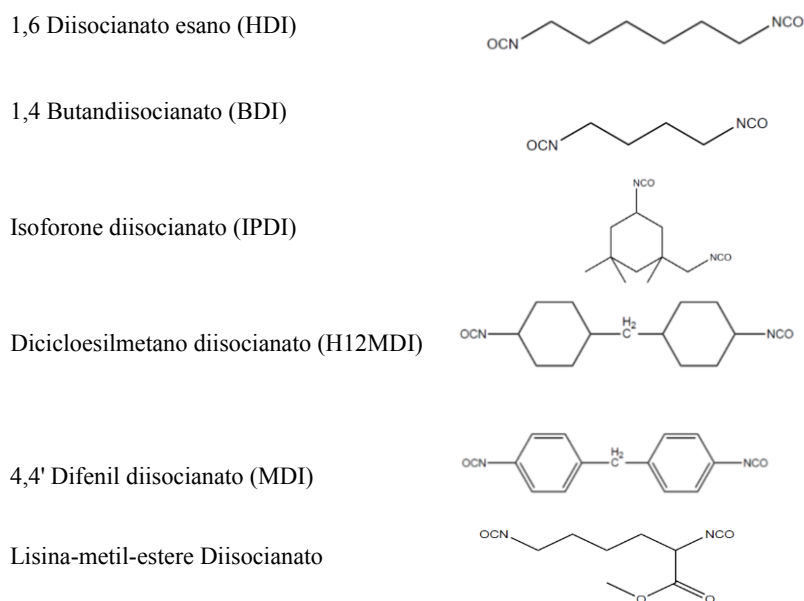
E' necessario che gli *scaffolds* in PU siano progettati in modo da ottenere una degradazione *in vivo* controllabile in prodotti non citotossici, riassorbibili ed eliminabili in modo da non prevedere una rimozione chirurgica aumentando la compliance del paziente. Una strategia che permette il controllo dell'entità di degradazione è quella che prevede l'incorporazione di sistemi sensibili all'ambiente chimico che li circonda subendo degradazione idrolitica, enzimatica o ossidativa (Zhang, et al., 2016). L'incorporazione di legami disolfuro, come ad esempio il glutatione (GSH) (Xu, et al., 2015), funge da *trigger* biologico per la degradazione degli *scaffolds*, in seguito all'esposizione ad un ambiente riducente.

Nelle applicazioni di medicina rigenerativa, gli *scaffolds* costituiti da PU biodegradabili sono preferiti e fabbricati con ceramiche bioattive, polimeri o una combinazione di entrambi, a seconda delle proprietà superficiali desiderate, del comportamento meccanico e dell'attività biologica (Mi, et al., 2014). Il PU possiede il vantaggio della calcificazione progressiva *in vivo* attraverso la formazione di cristalli di fosfato di calcio. Inoltre, prodotti di degradazione del PU, se selezionati con cura, non influenzano il pH locale (Marzec, et al., 2017).

1.9.1 Poliuretani in ambito biomedicale

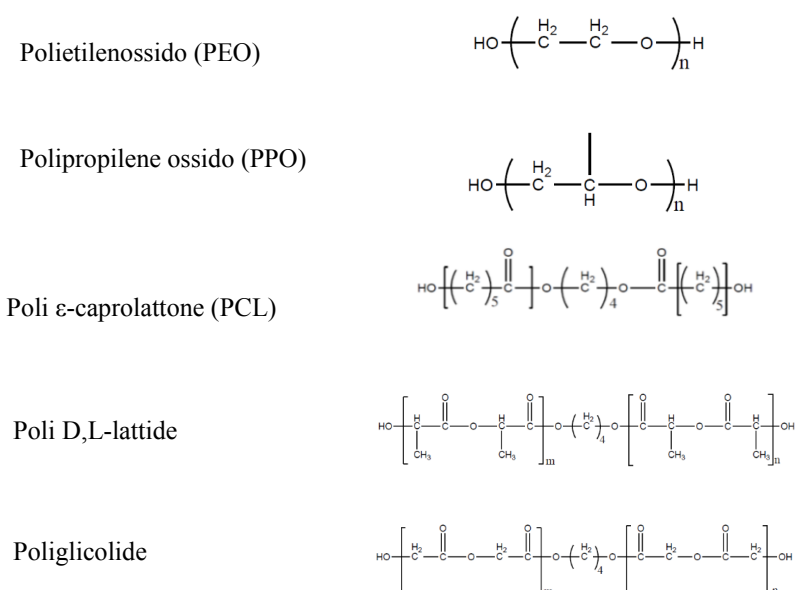
I poliuretani per uso medico sono sintetizzati scegliendo accuratamente i reagenti idonei; per i diisocianati i principali sono: dicicloesilmetano diisocianato (H12MDI), esametildiisocianato (HDI) e 1,4-butandiisocianato (BDI) e l'MDI (4,4'-difenilmetano diisocianato); alcuni esempi sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Principali diisocianati utilizzati nella sintesi dei poliuretani a scopo biomedicale



La Tabella 3 riporta i principali polioli utilizzati nella sintesi di poliuretani.

Tabella 3. Principali polioli utilizzati nella sintesi dei poliuretani a scopo biomedicale



1.9.2 Poliuretani biodegradabili

La biodegradazione degli *scaffolds* è una delle principali caratteristiche da considerare per il successo della riparazione dei tessuti (Zhang, et al., 2013) soprattutto quelli molli, quali i tessuti nervosi, valvole cardiache, pelle, muscoli e innesti vascolari, in cui si richiedono *scaffolds* altamente porosi, biodegradabili e bioattivi. La porosità infatti controlla anche la degradazione dello *scaffold*, dove un maggiore assorbimento di acqua è dovuto a una maggiore porosità che causa il rigonfiamento dello stesso.

Questo aiuta la degradazione attraverso la dissoluzione ed altri meccanismi (Ng, et al. 2017).

Le proprietà meccaniche degli *scaffolds* biodegradabili possono essere migliorate incorporando polimeri naturali o sintetici. Ad esempio, il PCL miscelato con *scaffold* di poliuretani biodegradabili, migliora le interazioni biologiche, la biocompatibilità, le proprietà meccaniche e chimicofisiche (Mi, et al., 2018).

1.9.3 Stampa 3D di Poliuretani

Le tecniche più utilizzate nella produzione degli *scaffolds* in PU sono: *solvent casting/particle leaching*, *gas foaming* e *freeze drying* che permettono di ottenere scaffold 3D con una struttura porosa. Tuttavia, queste tecniche non risultano riproducibili e sono incapaci di creare modelli con una porosità controllata e uniforme (Janik & Marzec, 2015). La stampa 3D è una tecnica di fabbricazione alternativa da preferire grazie ad un preciso controllo su forme e dimensioni, caratteristiche imprescindibili per il successo dello *scaffold* (Mondschein, et al., 2017), sia per un eventuale rilascio del farmaco incorporato sia per la produzione di impianti specifici per il paziente, per garantire la loro ripetibilità e la riproducibilità (Janik & Marzec, 2015). Nonostante questi vantaggi, ad oggi in letteratura sono presenti pochi esempi di applicazione dei poliuretani nella stampa 3D ed alcuni di essi sono riportati in Figura 29 (Przybytek, et al., 2018).

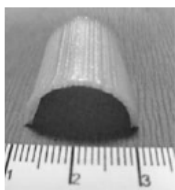
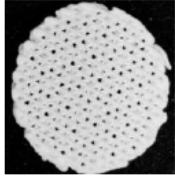
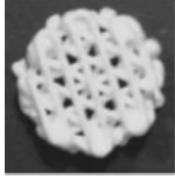
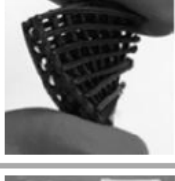
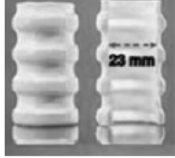
Materiali	Descrizione	3DP Tecniche	Produzione/ applicazione	test biologici	Immagini	Rif.
Tecoflex® (PUR)	- PU (polietere alifatico) di grado medico	sistema di stampa 3D personalizzato basato su una siringa di stampa in metallo e un ugello (200µm), stampa con una soluzione di PU (40% in cloroformio).	scaffold tracheale/ protesi patch-type	<i>in vivo/impiantato nella trachea del coniglio</i>		Jung e coll.
Dispersione acquosa di poliuretani	Polioli – PLA, PEBA, Diisocianato – IPDI, Chain extenders – DMPA/EDA + HA come enhancer di viscosità	low-temperature fused deposition manufacturing (LFDM)	scaffolds per la rigenerazione della cartilagine	<i>in vitro/MSCs umane</i> <i>in vivo/impiantati nel coniglio</i>		Hung e coll.
Dispersione acquosa di poliuretani	Polioli – PLA/PEBA, Diisocianato – IPDI, Chain extenders – DMPA/EDA + PEO come enhancer di viscosità	low-temperature fused deposition manufacturing (LFDM)	scaffolds per la rigenerazione della cartilagine	<i>in vitro/linea cellulare condrociti di ratto</i>		Hung e coll.
PUR/PLA/GO	Nanocompositi con GO (ossido di grafene), PUR – Pearlthane® (PCL-based)	FDM	scaffolds per l'ingegneria tissutale	<i>in vitro/cellule NIH3T3</i>		Chen e coll.
PUR	Polioli – polieter/ PCL, Diisocianato – MDI, Chain extender – BDO	FDM	Tessuto tracheale/ anelli cartilaginei	<i>in vitro/cellule HDF, BEC</i>		Tsai e coll.

Figura 29. Esempi di scaffolds in Poliuretano fabbricati con la tecnologia di stampa 3D (Przybytek, et al., 2018)

Tra questi, uno studio ha sviluppato un nuovo *scaffold* tracheale in poliuretano stampato in 3D, con architettura su micro scala, per fornire infiltrazione del tessuto ospite con proprietà biomeccaniche adeguate che resistono alle condizioni fisiologiche della trachea (Jung, et al., 2016). L'esame *in vivo* è stato condotto mediante l'implementazione degli *scaffolds* nel difetto tracheale anteriore dei conigli.

Un altro studio ha sviluppato un metodo di stampa 3D *water-based* sfruttando l'uso di una dispersione acquosa di PU elastico e biodegradabile. Gli *scaffolds* in PU stampati hanno mostrato proprietà meccaniche (resistenza alla compressione) vicine a quelle della cartilagine nativa. Secondo i risultati riportati, i condrociti sono stati seminati in modo efficiente sugli *scaffolds* e hanno proliferato e secreto la matrice extracellulare (Hung, et al., 2016).

Attualmente, le tecniche di stampa più usate per la produzione di *scaffolds* 3D di PU sono la FDM, la SLA e il *bioplotting*.

L’FDM, come descritto precedentemente, è l'approccio di produzione additiva più comunemente utilizzato ed economico. Questa tecnica permette l'estrusione di filamenti di PU utilizzando anche miscele di PU termoplastici con altri materiali, come i poliesteri, con la possibilità di fornire nuove proprietà, che potrebbero offrire una maggiore specificità e applicabilità in campo biomedico (Griffin, et al., 2020). Il PLA, per esempio, è stato miscelato con il PU per migliorare la resistenza meccanica complessiva e la resistenza agli urti. Chen e coll., utilizzando la stampa FDM, hanno valutato, modificando i rapporti in peso tra PU e PLA, la stampa 3D di nanocompositi in presenza di ossido di grafene (GO) (Chen, et al., 2017). Quest’ultimo è stato incorporato nel filamento per le sue eccellenti proprietà termiche, elettriche e meccaniche (Figura 30).

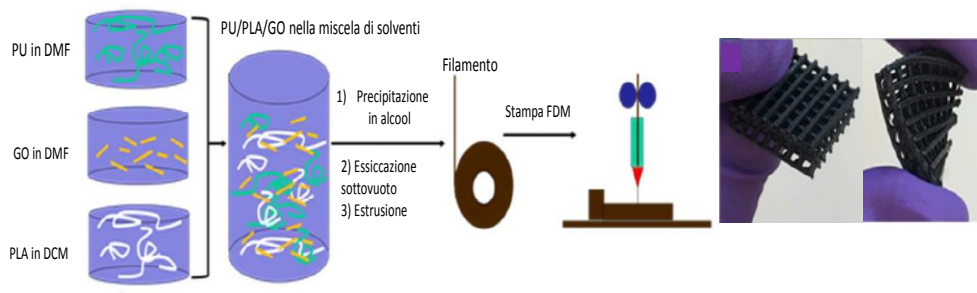


Figura 30. Stampa di un nanocomposito PU/PLA/GO tramite FDM (Chen, et al., 2017)

È stato osservato, inoltre, che l'orientamento della stampa influisce sulle proprietà meccaniche ed inoltre è stata riscontrata una buona biocompatibilità dei nanocompositi con le cellule NIH3T3, mostrando crescita, diffusione cellulare e proliferazione.

1.10 Esempi di applicazioni specifiche della stampa 3D nella rigenerazione tissutale: il tessuto osseo

L'osso è un tessuto dinamico e specializzato, caratterizzato dalla presenza di cellule di supporto come gli *osteoblasti*, responsabili della sintesi dei componenti della matrice, che derivano dalla differenziazione delle cellule osteoprogenitrici. Gli osteoblasti si sistemano in cavità ellissoidali non mineralizzate scavate nella matrice stessa, definite lacune ossee. In questa fase prendono il nome di *osteociti* e, pur rimanendo cellule vitali, entrano in uno stato di quiescenza.

Un altro tipo di cellule del tessuto osseo sono gli *osteoclasti*, deputate alla produzione di enzimi che agiscono degradando la matrice calcificata, permettendo il riassorbimento dell'osso. Questi enzimi entrano in gioco sia nei processi di crescita, durante i quali è necessaria la sostituzione del tessuto osseo immaturo (non lamellare) in tessuto osseo lamellare adulto, sia per permettere le successive rimodellazioni dell'osso.

Il tessuto osseo è costituito, oltre che da cellule, da una abbondante matrice di natura proteica e da una componente minerale calcificata. La frazione organica della matrice ossea è formata da una componente fibrillare, prevalentemente collagene di tipo I, glicoproteine di vario tipo, fattori di crescita, citochine. Una delle caratteristiche distintive del tessuto osseo, è quella di possedere elementi minerali nella sua matrice, che vanno a costituire un'impalcatura dura e compatta, essenziale per le funzioni di sostegno e di locomozione proprie dell'osso stesso. Tale componente minerale è costituita principalmente da calcio, combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno per formare una molecola cristallina definita idrossiapatite (Downey & Siegel, 2006; Gentili & Cancedda, 2009).

L'osso è capace di una rigenerazione continua del tessuto; grazie a questo ciclo continuo, i difetti e le fratture sono facilmente riparabili, ovviamente difetti più grandi richiedono un intervento esterno (Fogelman, et al., 2012). Se si verifica un processo di guarigione inadeguato, il processo di rimodellamento causa condizioni patologiche che portano allo sviluppo di disturbi ossei (Marie, 1992).

La stampa 3D permette la produzione di strutture di sostegno idonee per la rigenerazione ossea, in particolare, gli *scaffolds* si basano su componenti che mimano la struttura naturale dell'osso quali matrice, cellule, segnali cellulari per la rigenerazione del tessuto, garantendo la circolazione sanguigna per lo scambio di ossigeno e l'approvvigionamento dei nutrienti con rimozione delle sostanze di scarto (Saiz, et al., 2013). Lo scopo primario è fornire un microambiente per le cellule che simuli la matrice extracellulare, ambiente caratterizzato principalmente dalla presenza di proteine di collagene fibroso che consente il trasporto di molecole vitali come nutrienti, ossigeno, fattori di crescita e prodotti di scarto per la crescita cellulare e facilita l'interazione cellula-cellula, la migrazione cellulare nello *scaffold* e la vascolarizzazione (Holzwarth & Ma, 2011). Inoltre è necessario garantire un'adeguata resistenza meccanica e stabilità fisica dopo l'impianto.

I materiali di base idonei per la progettazione degli *scaffolds* del tessuto osseo possono essere suddivisi in tre gruppi fondamentali ovvero: materiali inorganici, polimerici e compositi.

Scaffolds inorganici (metalli, ceramica bioattiva e vetri)

Gli impianti metallici presentano alcuni svantaggi significativi come la non degradabilità e la limitata processabilità nell'ambiente biologico (Wang, et al., 2016). In letteratura, leghe a base di titanio (Ti), cobalto (Co) (CoCrMo) e acciai inossidabili sono ampiamente studiati grazie alla loro ottima resistenza meccanica, soddisfacente resistenza alla corrosione e biocompatibilità. Come biomateriali inorganici, i derivati del calcio, la bioceramica (idrossiapatite, HAp), il fosfato tricalcio (TCP), il fosfato bicalcico diidrato (DCPD), il fosfato di ottacalcio (OCP), i vetri bioattivi (silicato, borato, fosfato e vetri borosilicati) e loro compositi sono stati ampiamente utilizzati per la riparazione delle ossa danneggiate grazie alla loro somiglianza strutturale e chimica con la componente inorganica dell'osso (Stevens, 2008). Questi materiali sono in grado di attivare la formazione, deposizione e precipitazione di CaP e formano un legame diretto tra impianto e osso nativo (Kokubo, et al., 1990).

Scaffolds polimerici

Sono utilizzati sia polimeri sintetici che naturali tra cui il chitosano, il collagene, l'alginato, la fibroina della seta, l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL) e l'acido poli lattico-co-glicolico (PLGA). Tra questi, i polimeri sintetici sono facilmente modulabili dal punto di vista delle proprietà chimicofisiche, meccaniche e di biodegradazione, per cui spesso sono preferiti ai polimeri naturali. Ad esempio il PLA è usato come dispositivo ortopedico e per impianti (sotto forma di viti, perni, bacchette e reti) (Lasprilla, et al., 2012). È anche usato come materiale biodegradabile e per *scaffolds* biocompatibili in applicazioni di medicina rigenerativa del tessuto osseo.

Lin e coll. hanno sviluppato nanofibre con idrossiapatite (HAp) su acido polilattico (PLA) rivestito con chitosano (CS) come *scaffold* per il tessuto osseo. I loro risultati mostrano che gli *scaffolds* nanocompositi HAp/CS/PLA siano più simili al tessuto osseo nativo e siano in grado di aiutare la rigenerazione ossea (Lin, et al., 2014a).

In un altro studio, Mi e coll. hanno prodotto un poliuretano termoplastico (TPU) e *scaffolds* di acido polilattico (PLA) a vari rapporti. I loro risultati dimostrano che il materiale composito PLA/TPU ha una struttura e funzioni biologiche simili all'osso naturale (Mi, et al., 2013).

Il policaprolattone (PCL) è un poliestere biocompatibile e biodegradabile, è principalmente utilizzato per le rigenerazioni ossee grazie alle sue eccellenti proprietà meccaniche e alla sua facile lavorabilità. Studi recenti hanno dimostrato che il PCL è un materiale biocompatibile ottimale da utilizzare per la rigenerazione di ossa e cartilagine. Uma Maheshwari e coll. hanno progettato uno *scaffold* nanocomposito a doppio strato polimero-ceramica a base di policaprolattone elettrofilato e alcool polivinilico (doppio strato PCL/PVA), con nanoparticelle di idrossiapatite. I risultati hanno dimostrato che questi sistemi PVA/HA/PCL hanno un eccellente adattamento del tessuto ospite e hanno un grande potenziale per l'ingegneria dei tessuti (Uma Maheshwari, et al., 2014).

Scaffolds compositi

A causa del carico e della forte resistenza meccanica necessaria, i materiali compositi sono stati ampiamente utilizzati per unire i vantaggi di due o più materiali per soddisfare queste esigenze. Un importante tipo di materiali compositi impiegati nella rigenerazione di tessuto osseo riguarda i compositi polimeri/componenti inorganici che uniscono l'elasticità della fase polimerica e la forza e la rigidità della fase inorganica. Questi compositi forniscono una resistenza meccanica avanzata, nonché proprietà e profili di degradazione ottimali. Inoltre, l'incorporazione di materiali ceramici consente una migliore lavorabilità e un controllo sull'uniformità. Per esempio, l'aggiunta di idrossiapatite a polimeri sintetici biodegradabili come PLA, PCL e PLGA ha portato alla formazione di materiali compositi che possiedono eccellenti proprietà meccaniche e un'ottima osteoattività (Kim, et al., 2004a). Laurencin e coll. hanno prodotto compositi 3D di PLGA ed idrossiapatite (HAp) (50:50) utilizzando la tecnica di *solvent leaching/particle leaching*. La coltura *in vitro*, su osteoblasti, ha mostrato che gli *scaffolds* PLGA-HAp supportano la proliferazione cellulare, la differenziazione e la formazione della componente minerale. La degradabilità del PLGA e le proprietà meccaniche di HAp rappresentano un'ottimale combinazione per la guarigione delle ossa. I risultati hanno indicato l'eccellente potenziale dei sistemi polimerici compositi nella guarigione di difetti ossei di dimensioni critiche (Devin, et al., 1996).

1.11 Stampa 3D per la produzione di *scaffold* utili nel trattamento di patologie a carico del tessuto osseo: l'osteosarcoma

Le malattie a carico del tessuto osseo possono iniziare con un disturbo del movimento e portare anche alla morte nel tempo. Nei trattamenti, uno degli approcci più popolari, è quello di sostituire il tessuto osseo mediante le strategie proposte dall'ingegneria dei tessuti.

I più comuni tipi di disturbi ossei sono osteosarcoma, osteoporosi, artrosi, infezioni, problemi di rigenerazione e danni alle ossa (Gu, et al., 2013).

Come già accennato, il processo di rigenerazione ossea necessita di alcune molecole bioattive oltre alla sensibilità alle condizioni ambientali. Inoltre durante questi regolari processi di rigenerazione, può avere una elevata rilevanza terapeutica il rilascio controllato di agenti attivi, tramite lo sviluppo di sistemi di somministrazione di farmaci mirati al tessuto bersaglio. I sistemi di somministrazione di farmaci localizzati facilitano alte concentrazioni di farmaci nel sito bersaglio, rilascio prolungato e controllato, potenziata stabilità del farmaco, migliore efficacia, basso assorbimento sistemico e riduzione del rischio di tossicità sistemica (Wolinsky, et al., 2012).

Gli *scaffolds* ossei caricati con farmaci dovrebbero fornire una struttura adatta per la rigenerazione dell'osso, garantire il supporto e la protezione dei farmaci dall'ambiente esterno (Soundrapandian, et al., 2009). Il caricamento del farmaco può essere ottenuto mediante miscelazione diretta con il materiale che verrà poi utilizzato per lo *scaffold* (Taepaiboon, et al., 2006), utilizzando un carrier per il farmaco e incorporandolo poi nel polimero (Pehlivan, et al., 2015); oppure caricando superficialmente lo *scaffold* con una soluzione di farmaco tramite *coating* (Kim, et al., 2004b).

L'osteosarcoma è una forma altamente aggressiva di neoplasia muscoloscheletrica. Il segno istologico di questo tumore è la formazione di osteoidi maligni e si ritiene che abbia origine da cellule primitive mesenchimali che formano l'osso (Picci, 2007). Le cellule cancerose in questi tumori assomigliano alle prime forme di cellule ossee che normalmente promuovono l'osteogenesi; tuttavia, il tessuto osseo nell'osteosarcoma non è forte come quello delle ossa normali. Sono stati riconosciuti vari sottotipi di osteosarcoma, l'osteosarcoma classico è un raro tumore maligno che rappresenta solo lo 0,2% di tutti i tumori maligni e ha un'incidenza annuale stimata di 3 casi per milione di abitanti. Tuttavia, la prognosi è estremamente sfavorevole e il tasso di mortalità e di disabilità è elevato. È il tumore osseo maligno più comune tra i bambini e gli adolescenti di età inferiore ai 24 anni (Guillon, et al., 2011). Analogamente al

trattamento di altri tumori maligni, la chemioterapia, la radioterapia e la chirurgia sono le principali modalità di trattamento attualmente disponibili per l'osteosarcoma. La terapia richiede una resezione completa del sito del tumore mediante intervento chirurgico e trattamento con più di un agente antineoplastico prima dell'intervento (neoadiuvante) e postoperatorio (adiuvante). Nei pazienti a cui viene diagnosticato, il trattamento include anche la radioterapia (Ritter & Bielack, 2010). In caso di sostituzione del sito tumorale, è necessaria l'applicazione di una endoprotesi, di allotrapianti o di autoinnesti.

Il trattamento dell'osteosarcoma è ancora impegnativo nonostante il miglioramento della tecnologia nella somministrazione di farmaci, radioterapia e chirurgia. La maggior parte degli osteosarcomi ha ancora bisogno sia della chemioterapia che della resezione chirurgica del sito del tumore a causa della diffusione o del rischio di recidiva.

Gli agenti chemioterapici vengono solitamente somministrati per via sistemica, tramite vie intraarteriose o endovenose. Il numero di metastasi o la probabilità di recidiva può essere ridotto o ritardato con la chemioterapia (Ta, et al., 2009). I chemioterapici più comunemente usati, nel trattamento della patologia, includono la Doxorubicina (ADM), il Cisplatino (CDP), Isofofamide (IFO) e Metotrexato ad alto dosaggio (MTX) con il Leucovorin (Luetke, et al., 2014).

La Doxorubicina è tra i chemioterapici preferiti nel trattamento dell'osteosarcoma; si tratta di un antibiotico antineoplastico della famiglia delle antracicline, dotato di un ampio spettro antitumorale. Il farmaco si lega al DNA cellulare inibendo la sintesi degli acidi nucleici e la mitosi e provocando aberrazioni cromosomiche (Rivankar, 2014).

Sfortunatamente, ci sono ancora molti problemi con la chemioterapia (Kraybill, et al., 2006) e gli attuali costi di trattamento per gli osteosarcomi sono molto alti. Queste terapie sono invasive, dolorose per i pazienti e non sono specifiche per le cellule tumorali. Sono necessarie alte dosi di chemioterapici per via sistemica per ottenere una sufficiente concentrazione di farmaco localizzata nel sito della lesione. Questo spesso porta a effetti avversi gravi e indesiderati come mielosoppressione, disfunzione epatica e renale, insorgenza di un nuovo tumore, sterilità e disturbi del sistema nervoso centrale che possono essere fatali. Inoltre, ci sono molti osteosarcomi che sono chemioresistenti e radioresistenti. Per superare sia gli effetti avversi dose dipendenti degli agenti chemioterapici convenzionali, sia il fallimento terapeutico derivante dalla

resistenza ai farmaci nell'osteosarcoma, sono stati dedicati enormi sforzi di ricerca per migliorare l'efficacia della chemioterapia (Kumar & Pillai, 2018).

Una valida alternativa alla somministrazione sistemica è la tecnologia impiantabile che permette la somministrazione di farmaci direttamente nel sito bersaglio. Tale tecnologia consente il rilascio prolungato di farmaci antitumorali per un periodo da settimane a mesi e talvolta anche anni. Il sistema impiantabile funge da mezzo di somministrazione locale del farmaco che si traduce in alte concentrazioni di farmaco nel sito di interesse riducendo al contempo l'esposizione sistemica al farmaco e quindi minimizzando gli effetti avversi indesiderati. Tuttavia, i materiali impiantabili tradizionali possono essere caricati solo con singoli farmaci, per cui la richiesta di una chirurgia secondaria e l'incapacità di personalizzare il trattamento ne limita anche l'applicazione clinica.

Al fine di fabbricare dispositivi impiantabili idonei per la somministrazione di farmaci per il trattamento dell'osteosarcoma, caratterizzati da biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività (Zhou, et al., 2017), una tecnica utile risulta essere la stampa 3D, grazie all'alto grado di flessibilità e controllabilità che consente la preparazione di forme complesse con dosaggi personalizzati e con diversi profili di rilascio migliorando dunque la precisione della terapia personalizzata (Khaled, et al., 2014).

Wang e coll., hanno combinato la chemioterapia personalizzata con un trattamento locale per l'osteosarcoma tramite l'uso di impianti per la somministrazione di farmaci a base di PLLA sfruttando una tecnica di stampa 3D, caricando diversi farmaci antitumorali quali Metotrexato, Cisplatino, Doxorubicina e Ifosfamida; dimostrando, tramite studi *in vivo*, come la chemioterapia locale favorisca una concentrazione locale del farmaco estremamente elevata, consentendo di migliorare notevolmente l'efficacia del farmaco e agendo direttamente sul sito del tumore riducendo gli effetti tossici causati dalla chemioterapia sistemica (Wang, et al., 2020). Lo studio ha dimostrato che è possibile ottenere il rilascio prolungato di farmaci nella sede di interesse e il prolungamento della loro durata di azione (Figura 31).

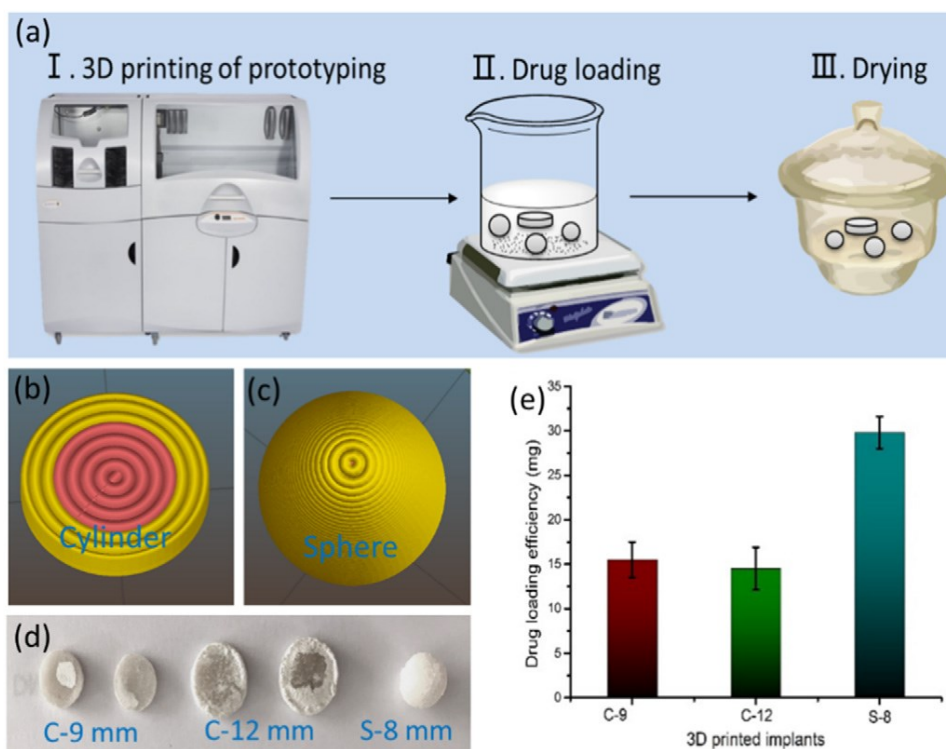


Figura 31. Progettazione, fabbricazione e caratterizzazione degli impianti stampati in 3D. (a) Illustrazione schematica del processo di produzione; immagini del modello 3D cilindrico (b) e sferico (c) degli impianti; (d) impianti di PLLA stampati in 3D; (e) efficienza di caricamento del farmaco (Wang, et al., 2020)

In un altro studio, Dang e coll. hanno sviluppato uno *scaffold* a base di fosfato tricalcico (TCP) stampato tramite stampa 3D con un rivestimento di microparticelle di stagno (TiN) e Doxorubicina (DOX) sulla superficie per ottenere un effetto sinergico tra la terapia fototermica e la chemioterapia per l'osteosarcoma (Dang, et al., 2021). L'eccellente effetto terapeutico è stato ottenuto sia *in vitro* che *in vivo* attraverso la precisa terapia fototermica e il rilascio controllato e localizzato del chemioterapico. Inoltre, gli *scaffolds* forniscono il supporto meccanico e rigenerativo per il tessuto osseo per compensare i difetti ossei derivanti dalla rimozione chirurgica dell'osteosarcoma (Figura 32).

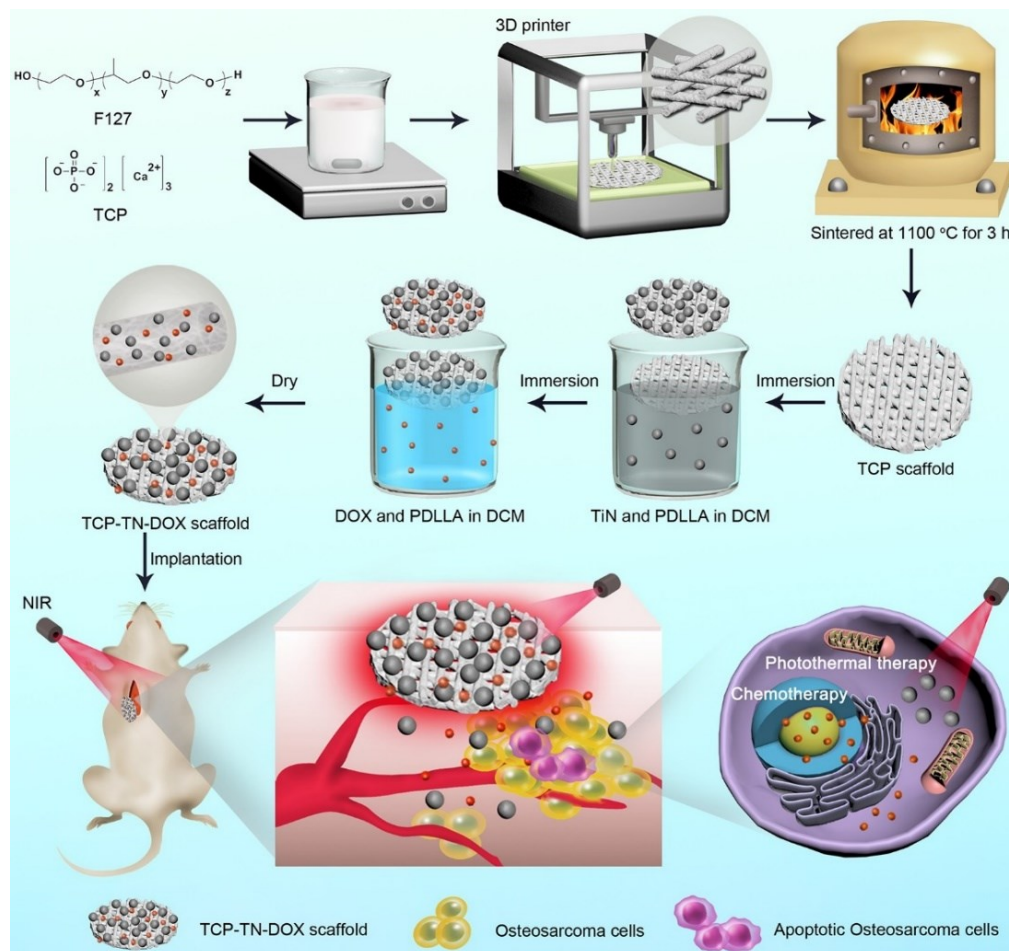


Figura 32. Illustrazione schematica della produzione e applicazione degli scaffolds TCP-TN-DOX per la terapia dell'osteosarcoma (Dang, et al., 2021)

Sun e coll. hanno prodotto un sistema composito PCL/HA caricato con Doxorubicina. Nella prima fase, hanno fabbricato lo *scaffold* in PCL con la tecnica di prototipazione rapida (Figura 33). Successivamente, hanno rivestito questi sistemi con una sospensione di Doxorubicina in PBS. Hanno impiantato i sistemi in topi e, in un gruppo di controllo hanno iniettato la stessa dose di Doxorubicina per via sottocutanea per valutare il comportamento di rilascio in vivo della Doxorubicina dagli *scaffolds*. L'immagine a fluorescenza delle aree impiantate ha mostrato un rilascio prolungato dagli *scaffolds* carichi di farmaco. È stato visto che la concentrazione plasmatica ottenuta dal rilascio del farmaco dagli *scaffolds* è stata di tre volte inferiore rispetto a quella del gruppo di controllo che ha previsto la via sottocutanea; questi risultati hanno indicato che gli effetti collaterali sistemici sono diminuiti grazie al rilascio dagli *scaffolds* migliorando inoltre le concentrazioni di farmaco nel sito di interesse (Sun, et al., 2016).

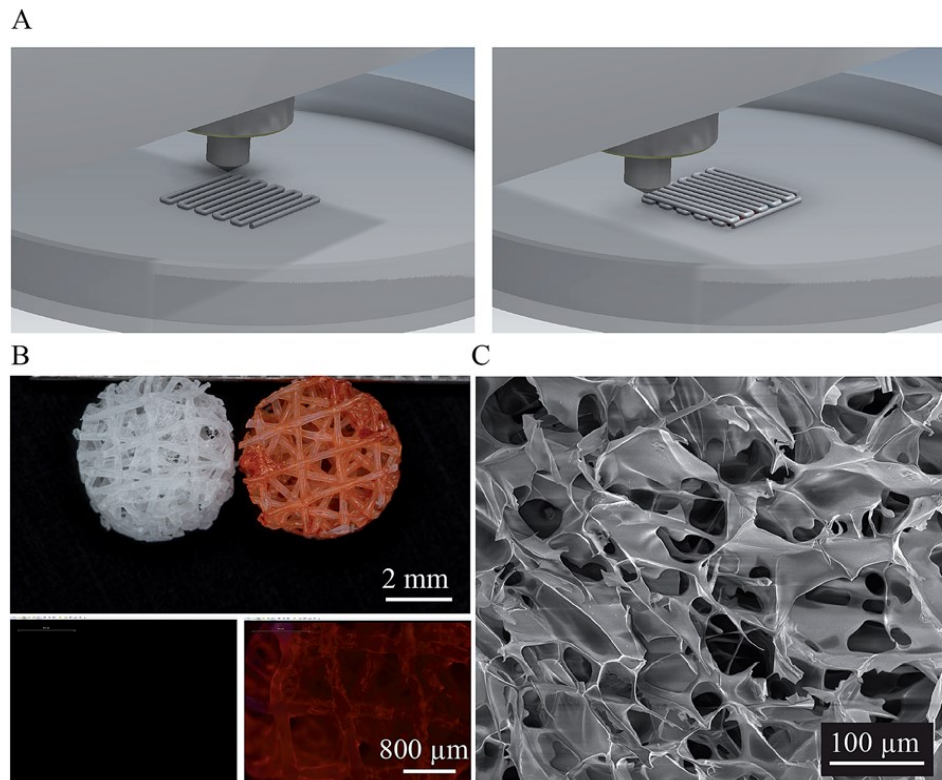


Figura 33. (A) Illustrazione schematica della fabbricazione dello scaffold stampato in 3D. Gli scaffolds in PCL/HA sono stati stampati strato per strato, nell'immagine A, a sinistra, viene mostrato uno strato dello scaffold mentre a destra due strati sovrapposti. Nell'immagine B si osserva la microscopia a fluorescenza che dimostra la presenza della Doxorubicina (scaffold destro) rispetto allo scaffold di soli PCL/HA (scaffold sinistro). In C è possibile osservare l'immagine SEM (Sun, et al., 2016)

2. Scopo della tesi

È già noto, come la stampa 3D, permetta di ottenere sistemi di rilascio personalizzati, su misura per ogni paziente, con vantaggi di precisione, bassi costi, con possibilità di utilizzare diversi materiali soprattutto nell'ingegneria dei tessuti, nel *drug delivery* e nella biomedicina. Grande attenzione è stata dedicata alla tridimensionalità degli *scaffolds* polimerici, in grado di fornire alle cellule un ambiente ideale per la crescita, un supporto meccanico temporaneo ed inoltre un sistema di rilascio di farmaci. Proprio per questo, la stampa 3D, è emersa come nuova tecnologia per soddisfare le esigenze relative alla personalizzazione, all'aderenza alla terapia e alla riduzione degli effetti collaterali.

In ambito biomedico, i polimeri naturali e, tra questi, i polisaccaridi hanno conosciuto una notevole applicazione per i diversi vantaggi, tra cui la biocompatibilità, la biodegradabilità e l'assenza di produzione di metaboliti tossici, il *cell signaling* e la capacità di stimolare l'adesione e la proliferazione cellulare. Tuttavia, le scarse proprietà meccaniche e la scarsa stabilità *in vivo*, hanno determinato la necessità di effettuare opportune funzionalizzazioni per migliorarne questi aspetti, ottenendo, quindi, derivati semisintetici aventi proprietà tali da consentirne l'applicazione in ingegneria tissutale e la processazione attraverso differenti tecniche di biofabbricazione, compresa la biostampa 3D.

Tra i vari polimeri naturali, la gomma gellano (GG) e l'acido ialuronico (HA) hanno mostrato notevoli potenzialità, tali da consentirne una larga applicazione in ambito biomedico. Tuttavia, come indicato già in precedenza, le proprietà di partenza di questi polimeri non sono tali da consentirne il loro uso nella formulazione di *bioinks*. Per tale motivo, scopo di questa tesi di Dottorato di Ricerca è stato quello di progettare e sintetizzare tramite funzionalizzazioni nuovi derivati, per migliorarne le prestazioni per la biostampa 3D.

Con questo scopo sono stati sintetizzati nuovi derivati della gomma gellano e dell'acido ialuronico per la successiva formulazione del *bioink*. In particolare, al fine di migliorare le prestazioni della gomma gellano sono stati utilizzati due polimeri sintetici: l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) e il polietilenglicole (PEG). Questi oltre a presentare caratteristiche chimiche e proprietà meccaniche modulabili, forniscono prestazioni prevedibili e un controllo preciso dei parametri della stampante. Viste tali considerazioni, sono stati sintetizzati nuovi copolimeri a innesto del GG: GG-*graft*-PLGA. Oltre alla caratterizzazione chimico-fisica di questi copolimeri, è

stata valutata *in vitro* la loro citocompatibilità. Inoltre, è stato studiato il loro comportamento reologico e sono state effettuate delle prove di stampa per testare la loro capacità di essere processati con una biostampante 3D ad estrusione e il loro potenziale impiego come *bioink*.

Un'ulteriore strategia adottata per superare i limiti di questo polisaccaride è stata quella di utilizzare il PEG come polimero sintetico per ottenere il nuovo derivato GG-EDA-PEG. Per la sintesi di questo nuovo derivato è stato utilizzato come polimero di partenza un derivato etilendiamminico della gomma gellano (GG-EDA) (Fiorica, et al., 2020) e un derivato aldeidico del PEG con la formazione di un legame imminico. Il PEG è stato usato come polimero sacrificale con lo scopo di migliorare inizialmente l'incorporazione cellulare e la successiva strutturazione del gellano in seguito alla perdita delle catene idrofile. Oltre alla sintesi e alla caratterizzazione chimico-fisica dei nuovi *inks* (privi di cellule) a base di GG-EDA-PEG, è stata effettuata una caratterizzazione reologica degli stessi e sono state eseguite prove di stampa al fine di valutare in via preliminare la possibile applicazione in biostampa 3D. In seguito, sono state valutate le proprietà reologiche di tali materiali in presenza di due diverse linee cellulari (MC3T3-E1 e HCT-116). Infine è stato valutato l'impatto sulle proprietà reologiche delle diverse densità cellulari testate, effettuando al contempo prove biologiche di citocompatibilità *in vitro*.

La formazione di legami dinamici e di idrogel *self-healing* è stata ulteriormente investigata in questa tesi di Dottorato per fornire agli idrogeli ottenuti proprietà meccaniche regolabili e stabilità chimica. Le basi di Schiff reagiscono, anche in condizioni blande, in modo reversibile consentendo agli idrogeli di recuperare le proprie strutture e funzioni; inoltre, la loro idrolisi pH sensibile consente, agli idrogeli prodotti, di rispondere a stimoli biologicamente rilevanti, utili nel *drug delivery*. Infine, la dinamicità di questo legame favorisce il processo di stampa con successiva strutturazione dell'idrogel quando depositato.

Per questi motivi, in questa tesi è stato progettato e caratterizzato un gel a base di acido ialuronico con proprietà *self-healing*, in grado di gelificare per mezzo della formazione di una base di Schiff. In particolare, è stata selezionata la dietilentriammina (DETA), allo scopo di inserire nel *backbone* polimerico dell'HA un gruppo amminico in grado di reagire in presenza di HA-aldeide per la formazione della base di Schiff. La DETA è stata scelta in considerazione della presenza di un gruppo amminico secondario che può generare una carica positiva in dipendenza del pH del mezzo. La presenza di una

carica positiva transiente sulla struttura dell'HA genera delle interazioni elettrostatiche intracatena tra la porzione DETA ed il gruppo COOH dell'unità glucuronica dell'HA in grado di rafforzare le interazioni che stabilizzano il gel dinamico formato.

Con lo scopo di testare come il grado di reticolazione influenzi le proprietà degli idrogeli, sono stati sintetizzati diversi campioni aventi rapporto molare CHO/NH₂ differente e questi sono stati caratterizzati da un punto di vista chimicofisico e biologico, valutando la citocompatibilità *in vitro* attraverso saggio MTS e *Live and Dead*. Sono state eseguite analisi di *strain sweep*, *frequency sweep* e *flow ramp* per studiare il comportamento reologico degli idrogeli a diverso rapporto molare, analisi di *frequency sweep* dopo il trattamento a pH 7.4 e pH 5.5 per valutare la pH sensibilità e analisi di *recovery time* per valutare le proprietà *self-healing*. Inoltre, sono state effettuate delle prove preliminari di stampa.

Considerati i vantaggi dell'utilizzo degli idrogeli con proprietà *self-healing* nel drug delivery, ulteriore scopo della presente tesi di Dottorato è stato quello di progettare un idrogel antibatterico per il rilascio di nanoparticelle di argento. L'HA-DETA è stato usato sia come agente riducente che agente stabilizzante delle nanoparticelle e sono stati eseguiti studi microbiologici preliminari.

Infine, è stato valutato l'uso di materiali sintetici nella stampa 3D, in quanto tali materiali presentano vantaggi relativi alla velocità e al basso costo di produzione, alla processabilità, all'elevata compatibilità con diversi farmaci, nonché alla possibilità di controllare i processi di degradazione e di rilascio del farmaco. Una classe di materiali polimerici di sintesi, idonea alla stampa, è rappresentata dai poliuretani, polimeri caratterizzati da grande versatilità chimica, grazie alla possibilità di modulazione delle loro proprietà chimicofisiche scegliendo opportunamente gli elementi di base utilizzati per la loro sintesi. In particolare, in questa tesi di Dottorato, è stato prodotto uno *scaffold 3D printed* a base di una poliuretanurea (PUU); tale *scaffold* è stato proposto come sistema impiantabile per il rilascio prolungato ad azione locale di Doxorubicina per un potenziale trattamento di tumori ossei. Lo *scaffold*, una volta impiantato, dovrebbe essere in grado di rilasciare il farmaco a livello del tessuto osseo in maniera stimolo sensibile, direttamente sul sito del tumore. In particolare, è stata preliminarmente messa a punto la sintesi e la caratterizzazione chimicofisica di una nuova classe di PUU biodegradabili e stimolo sensibili, ottenuti utilizzando copolimeri *tri-block* PCL-PEG-PCL come porzione *soft* e l'estere tetrametilico dell'L-glutazione ossidato (GSSG-OMe₄) come *chain-extender* redox sensibile. Quindi, è stato

selezionato il derivato poliuretanoico ottimale per la processazione con stampa 3D tramite la tecnica del *solvent-casting 3D printing*, che ha permesso l'incorporazione di una consistente percentuale in massa di nanoparticelle di idrossiapatite. Inoltre, sono state messe a punto la procedura di stampa e di caricamento della Doxorubicina, lo studio di rilascio in condizioni mimanti il microambiente acido e riduttivo tipico della matrice extracellulare tumorale, nonché lo studio *in vitro* di biocompatibilità dello *scaffold* verso gli osteoblasti e la valutazione della citotossicità dello *scaffold* caricato con il farmaco.

3. Risultati e discussioni

3.1 Un nuovo *bioink* a base di un derivato della gomma gellano funzionalizzato con PLGA: sintesi, caratterizzazione e valutazione della stampabilità in 3D

3.1.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero GGm-PLGA

Al fine di valutare i cambiamenti sulle proprietà chimicofisiche della gomma gellano, dovuti all'inserimento delle catene di poliestere, sono stati sintetizzati tre diversi copolimeri GGm-PLGA. In particolare, per la sintesi è stato impiegato un derivato a basso peso molecolare della gomma gellano, qui indicato come GGm, in quanto forma una dispersione acquosa meno viscosa rispetto al Gelrite[®] di partenza, permettendo una migliore valutazione del contributo delle catene poliesteree sulle proprietà chimicofisiche del polisaccaride.

Nello specifico, i tre copolimeri GGm-PLGA, denominati a, b e c, sono stati sintetizzati tramite l'attivazione preliminare del GGm-TBA con 4-NPBC, seguita dalla sostituzione nucleofila, dei gruppi ossidrilici primari, presenti nelle unità ripetitive della gomma gellano, con PLGA-EDA. In particolare, questa reazione, che porta alla funzionalizzazione del polisaccaride, è stata effettuata in DMSO_a ed è schematicamente illustrata in Figura 34.

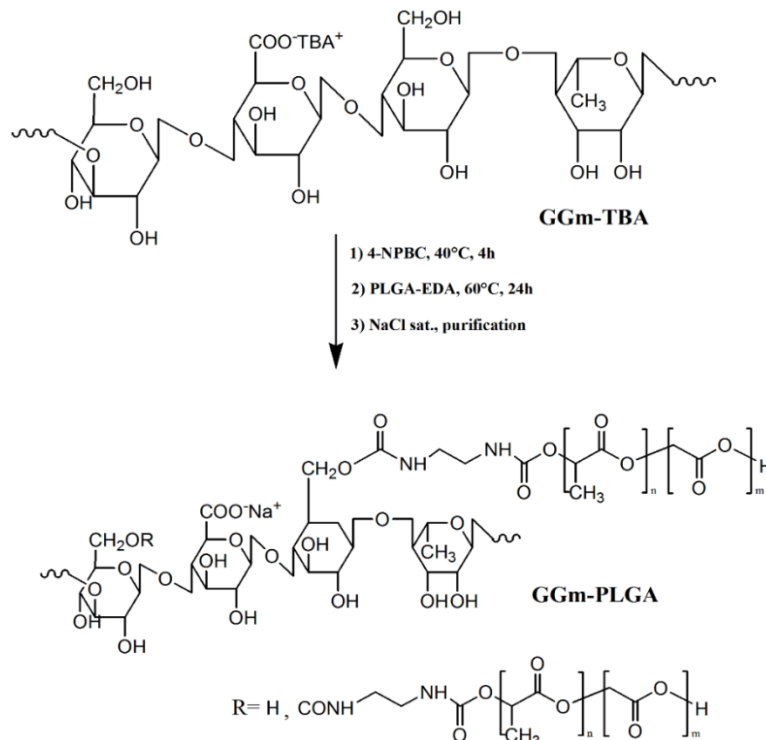


Figura 34. Rappresentazione schematica della sintesi del GGm-PLGA

Successivamente, i tre derivati GGm-PLGA ottenuti sono stati caratterizzati per confermare il *grafting* del PLGA sulle catene del GGm.

Lo spettro ATR-FTIR del GGm mostra un'ampia banda di assorbimento a 3300 cm^{-1} , caratteristica dello *stretching* O-H, e un picco debole a $\sim 1160\text{ cm}^{-1}$ dovuto allo *stretching* del legame C-O-C degli anelli a 6 termini degli zuccheri che formano il GG. Inoltre, i picchi che appaiono a 1600 e 1400 cm^{-1} sono attribuibili agli *stretching* C=O dell'acido carbossilico dell'acido glucuronico (Sudhamani, et al., 2003).

Allo scopo di verificare l'avvenuta funzionalizzazione chimica tra il GGm e il PLGA, sono stati confrontati gli spettri ATR-FTIR dei derivati GGm-PLGA (a, b e c) e del GGm (Figure 35a). Nello specifico, la modifica chimica con il PLGA è stata confermata dalla presenza di una banda a $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$, corrispondente allo *stretching* del legame C=O degli esteri, assente nello spettro del GGm di partenza, che aumenta in intensità all'aumentare del grado di derivatizzazione. Il legame chimico tra il GGm e il PLGA è stato ulteriormente confermato dalla presenza di bande di deformazione asimmetrica del CH_3 (a 1365 cm^{-1}) e del CH_2 (a 1450 cm^{-1}) del PLGA e della banda I ammidica (*stretching* del gruppo C=O) a $\sim 1705\text{ cm}^{-1}$.

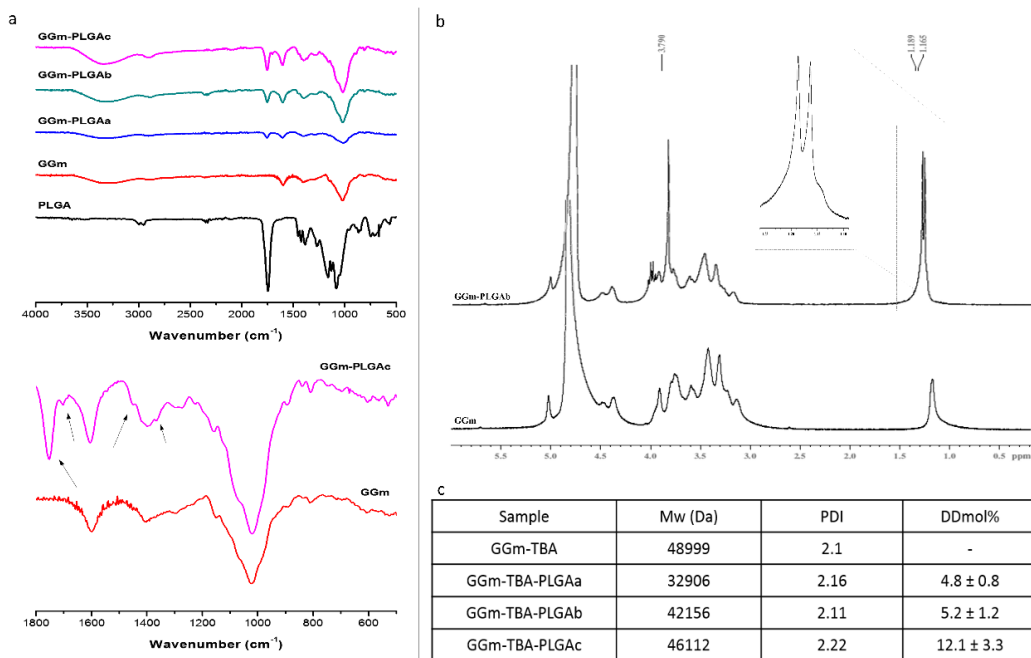


Figura 35. (a) Spettri ATR-FTIR del GGm (rosso), GGm-PLGAa (blu), GGm-PLGAb (verde), GGm-PLGAc (fucsia) e PLGA (nero) nell'intervallo $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (in alto) e spettri ATR-FTIR del GGm e del GG-PLGAc nell'intervallo $1800\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (in basso); (b) Spettro ¹H-NMR del GGm e del GGm-PLGAb; (c) Valori del peso molecolare medio ponderale (Mw), dell'indice di polidispersità (PDI) e del grado di derivatizzazione (derivatization degree, DD) del GGm-TBA e dei copolimeri GGm-TBA-PLGA

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero GGm-PLGAb, riportato in Figura 35b, rispetto allo spettro $^1\text{H-NMR}$ del polisaccaride non modificato, mostra segnali a δ 3.79 e δ 1.16, attribuiti, rispettivamente, ai protoni metilenici (CH_2) e ai protoni metilici (CH_3) presenti nelle unità ripetitive del PLGA legato. Sfortunatamente, nello spettro del copolimero, è risultato molto complicato discriminare il segnale relativo al gruppo metilico del ramnosio della gomma gellano (presente a δ 1.18) dal segnale del gruppo metilico del PLGA (δ 1.16). Pertanto, il valore dell'area relativa ai gruppi metilici del PLGA è stato calcolato indirettamente considerando il picco della porzione del PGA, situato a δ 3.79, e tenendo presente il rapporto molare PLA:PGA, pari a 50:50. Una volta determinata l'area attribuibile ai gruppi metilici del PLGA, è stato possibile discriminare il contributo del metile delle unità di ramnosio dall'area totale dei picchi. Infine, il grado di derivatizzazione in PLGA dei copolimeri GGm-PLGA è stato determinato paragonando l'integrale del picco attribuito ai gruppi metilici del PLGA, con l'integrale del picco relativo al CH_3 del ramnosio del GG, ottenuto come descritto sopra.

Il grado di funzionalizzazione in PLGA dei derivati GGm-PLGA è risultato essere pari a 4.8 ± 0.8 mol% per il copolimero a, 5.2 ± 1.2 mol% per il copolimero b, e 12.1 ± 3.3 mol% per il copolimero c (Figura 35c). I valori del peso molecolare medio ponderale (*average weight molecular weight*, M_w) e dell'indice di polidispersità (PDI), ottenuti mediante analisi SEC, per il GGm-TBA o per i copolimeri GGm-TBA-PLGA sono riportati in Figura 35c.

A causa delle interazioni idrofobiche e dell'eventuale aggregazione dei polimeri per effetto del solvente (acqua), non è stato possibile determinare il peso molecolare dei copolimeri in fase acquosa, pertanto l'analisi è stata eseguita in DMF.

I risultati hanno evidenziato che il M_w dei copolimeri aumenta proporzionalmente in funzione del grado di funzionalizzazione. Il tempo di eluizione dei copolimeri *grafted* è risultato essere leggermente ridotto rispetto a quello del GGm-TBA che, invece, presenta un valore di M_w più alto; questo probabilmente è dovuto alla diversa disposizione del polimero nel solvente organico (DMF).

I calcoli effettuati si basano sul volume idrodinamico dei polimeri lineari che differisce da quello dei copolimeri a innesto. In particolare, si suppone che la repulsione elettrostatica tra i gruppi carichi del GGm-TBA sia stata schermata dalle catene *grafted* di poliestere, permettendo così alle macromolecole di disporsi in una conformazione più compatta, riducendo, dunque, la loro dimensione idrodinamica.

3.1.2 Prove reologiche

L'analisi termoreologica è stata eseguita per studiare il comportamento viscoelastico dei copolimeri GGm o GGm-PLGA, che è correlato alla capacità delle macromolecole di formare strutture a doppia elica ordinate quando la temperatura diminuisce. In particolare, ogni campione è stato posto sulla piastra a 60 °C (Figura 36a) e la temperatura è stata poi ridotta per valutare la dipendenza dei moduli elastico e viscoso al diminuire della temperatura e per determinare come le catene di poliestere influenzino il punto di gelificazione. Ciò corrisponde a un punto di flesso in cui il modulo elastico G' aumenta notevolmente e rappresenta un parametro chiave spesso monitorato per controllare la viscosità del bioinchiostro e per indurre la gelificazione in situ di polimeri sensibili alla temperatura (Fedorovich, et al., 2008; Jungst, et al., 2016; Skardal, et al., 2010a).

I profili di G' e G'' del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA in relazione alla temperatura sono mostrati in Figura 36b. A temperatura elevata, i valori dei moduli per i copolimeri GGm-PLGAa e b sono simili ai valori del GGm e un comportamento fluido ($G' < G''$) è osservato per i copolimeri GGm e GGm-PLGA a e b. Al diminuire della temperatura si verifica la transizione sol-gel ($G' > G''$). In particolare, il GGm ha mostrato caratteristiche *gel-like* già a 50 °C, mentre i copolimeri GGm-PLGAa e GGm-PLGAb hanno mostrato un *crosspoint* a 40 °C e 45 °C rispettivamente, il che significa che il tempo di gelificazione è più lento del GGm. Il copolimero GGm-PLGAc, d'altra parte, non ha mostrato un punto di *crosspoint*, con caratteristiche *gel-like* in tutta la gamma di temperatura analizzata (60 °C - 5 °C). Inoltre, un valore di G' di 10 Pa è stato osservato a 60 °C con un aumento significativo al diminuire della temperatura, raggiungendo un valore di circa 2 kPa a 5 °C.

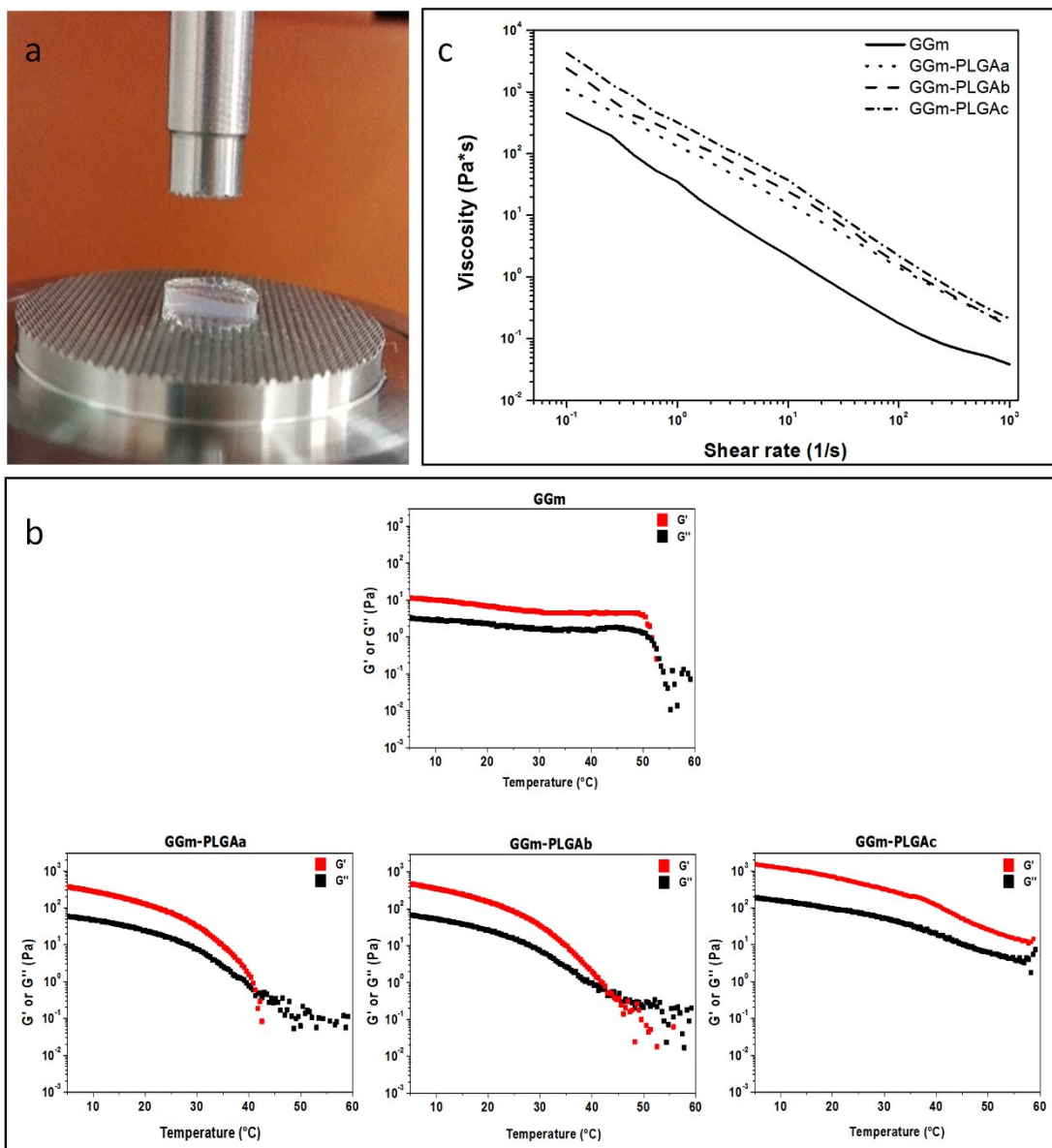


Figura 36. (a) Campione di GGm-PLGAb prima dell'esecuzione delle analisi reologiche; (b) dipendenza dalla temperatura dei moduli elastico (G') e viscoso (G'') del GGm e dei copolimeri dispersi (5% p/v); (c) Valori di viscosità in funzione dello shear rate delle dispersioni acquose del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA (5% p/v)

Secondo Agnello e coll. (Agnello, et al., 2018), i dati ottenuti possono essere spiegati considerando la cooperazione tra due meccanismi: la transizione *coil-to-helix* e l'interazione idrofobica. Il contributo specifico di ogni meccanismo al comportamento finale dipende fortemente dalla quantità di catene in poliestere. Inoltre, la temperatura ha un notevole effetto sull'interazione idrofobica (essendo un processo guidato dall'entropia). Quando la temperatura diminuisce, la transizione *coil-to-helix* porta alla gelificazione del materiale, questo è il meccanismo che avviene per il GGm (Rinaudo, 2001). È possibile supporre che le catene di PLGA interferiscano con questo meccanismo, con conseguente abbassamento della temperatura di transizione

probabilmente a causa dell'ostacolo delle catene di poliestere che ritardano il processo di gelificazione della gomma gellano.

In generale, possiamo supporre che, poiché il copolimero è più ricco in PLGA, il contributo dell'effetto associativo appare più pronunciato dell'effetto interferente sulla transizione *coil-helix* e porta alla gelificazione data dall'interazione idrofobica in acqua. Di conseguenza è stato osservato: (i) un aumento della temperatura di transizione per il GGm-PLGAb rispetto al GGm-PLGAa e (ii) l'assenza della temperatura di transizione per il GGm-PLGAc. Inoltre, all'aumentare del grado di sostituzione, è stato osservato un forte aumento dei valori di G' e G'' . Ciò è probabilmente correlato non solo alla presenza di un maggior numero di interazioni, come descritto sopra, ma anche all'aumento del peso molecolare del copolimero.

In conclusione, il comportamento termotropico del GGm è notevolmente influenzato dai sostituenti nelle soluzioni acquose (Xu, et al., 2019), e il punto di gelificazione può essere facilmente modulato modificando il grado di sostituzione. La modificazione chimica ha permesso di ottenere campioni, come il GGm-PLGAa e b, che possono essere stampati a temperature leggermente superiori alle condizioni fisiologiche, in grado di assumere un comportamento *gel-like* a 37 °C.

Il comportamento pseudoplastico è un fattore critico per le applicazioni di biostampa dal momento che il bioinchiostro dovrebbe avere una viscosità sufficientemente bassa da consentire una corretta estrusione e, contestualmente, dovrebbe essere in grado di mantenere la propria forma una volta depositato (Wilson, et al., 2017; Liu, et al., 2017). Per studiare il comportamento reologico delle dispersioni acquose dei campioni, sono state eseguite prove di *flow ramp* (Figura 36c).

Nello specifico, i diversi campioni sono stati sottoposti ad una sollecitazione di taglio crescente da 0.1 s^{-1} fino a 1000 s^{-1} . I dati, riportati in Figura 36c nel grafico log-log della viscosità in funzione dello *shear rate*, hanno mostrato una diminuzione della viscosità al crescere della velocità di taglio.

Durante il processo di stampa, il materiale è soggetto a sforzi di taglio tali per cui si verifica un allineamento delle catene polimeriche nella direzione del flusso (Figura 37), con conseguente decremento della viscosità e facilità nell'estrusione (García, et al., 2011; Critchley & Kelly, 2017).

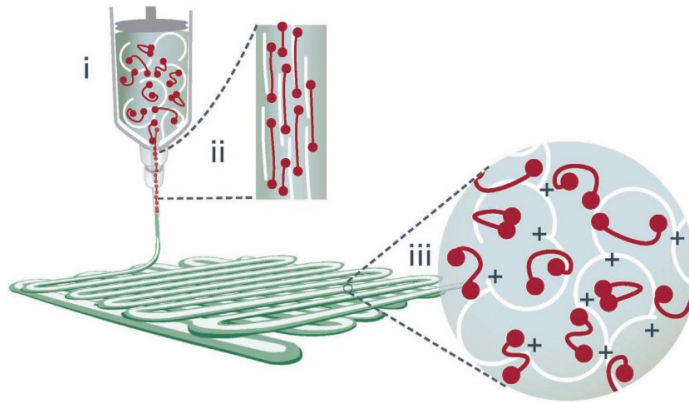


Figura 37. Rappresentazione schematica del comportamento pseudoplastico del bioink. (i) Nella siringa le catene polimeriche formano un network temporaneo e i valori di viscosità sono alti. (ii) Durante il processo di estrusione, a causa dello sforzo di taglio, si verifica l'allineamento delle catene polimeriche con conseguente riduzione dei valori di viscosità. (iii) Dopo la deposizione del bioink le catene polimeriche formano nuovamente il network e si ha il ripristino della viscosità iniziale (Malda, et al., 2013)

Sebbene l'andamento della viscosità dei copolimeri risulti simile a quello del GGm, mostrando un comportamento pseudoplastico, i valori di viscosità a basse velocità di taglio aumentano gradualmente all'aumentare del grado di derivatizzazione. In particolare, i valori di viscosità sono $450 \text{ Pa}\times\text{s}$ per il GGm e $4 \text{ kPa}\times\text{s}$ per il copolimero GGm-PLGAc, a 0.1 s^{-1} . Mentre, con l'aumento della velocità di taglio a 1000 s^{-1} , la viscosità diminuisce fino a raggiungere valori di $1 \text{ Pa}\times\text{s}$ per ciascun campione a causa di una riduzione delle interazioni polimeriche tra le catene adiacenti.

Nonostante si osservi un comportamento pseudoplastico per tutti i campioni, si evidenzia una più veloce riduzione della viscosità per il GGm rispetto a quella dei copolimeri GGm-PLGA (Figura 36c). Questo fenomeno è principalmente associato alla rottura delle interazioni idrofobiche, pertanto, per ottenere gli stessi valori di viscosità del GGm sono necessari valori di *shear rate* maggiori.

Il comportamento pseudoplastico consente una facile estrusione degli idrogeli da una siringa esercitando bassi valori di pressione; in questo modo si ha una riduzione dello sforzo di taglio che agisce sulle eventuali cellule incapsulate nel bioinchiostro, con conseguente elevata vitalità cellulare dopo il processo di stampa (Panwar & Tan, 2016; Ooi, et al., 2018). Dunque, è chiaro che le proprietà pseudoplastiche contribuiscono positivamente alla biostampa 3D, garantendo, allo stesso tempo, vitalità cellulare e mantenimento della forma del costruito finale (Murphy & Atala, 2014; Highley, et al., 2015; Nair, et al., 2009; Ouyang, et al., 2016b).

Gli studi di *frequency sweep* delle dispersioni acquose del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA, registrati a 37°C , hanno mostrato, come riportato in Figura 38, un

andamento tipico dei fluidi pseudoplastici, con il modulo elastico (*storage modulus*), G' , e il modulo viscoso (*loss modulus*), G'' , quasi indipendenti dalla frequenza applicata nel range testato.

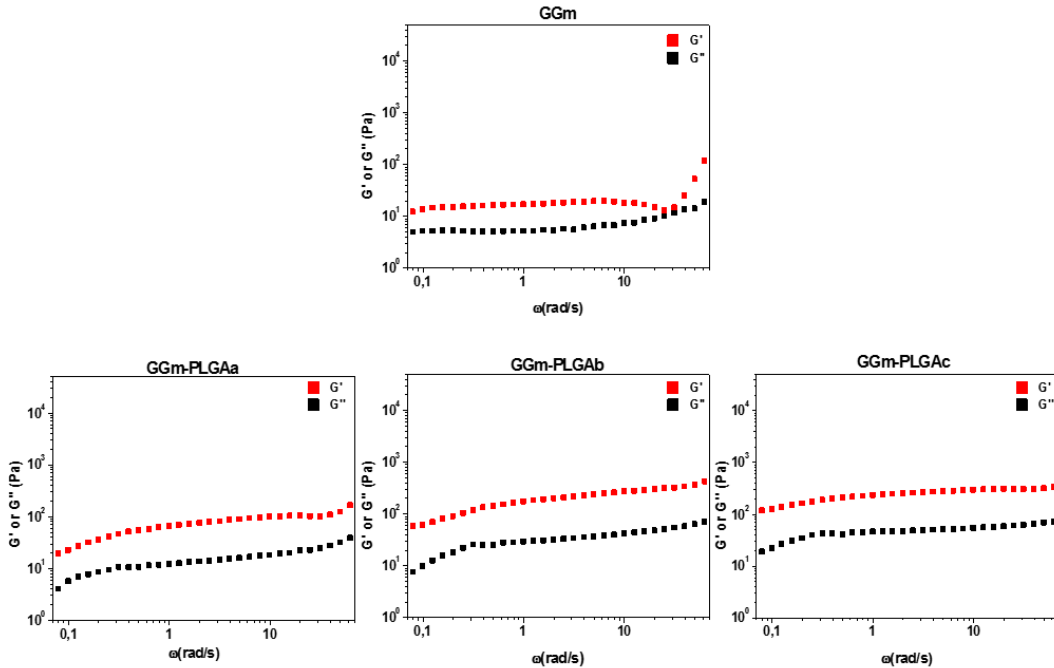


Figura 38. Prove di frequency sweep del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA non reticolati in acqua bidistillata. Gli esperimenti sono stati eseguiti al 10% di strain

In Figura 38 è possibile notare l'influenza delle catene di poliestere sul valore dei moduli elastico e viscoso degli idrogeli. In particolare, si assiste ad un aumento di questi valori all'aumentare della funzionalizzazione in PLGA, mostrando un incremento di circa un ordine di grandezza per il copolimero GGm-PLGAc rispetto al GGm (G' era 10-20 Pa nell'intero intervallo di frequenza analizzato). La debole struttura del GGm è stata confermata dal fatto che la differenza tra i componenti elastici e viscosi era inferiore alla metà di un ordine di grandezza, una differenza che è aumentata per i copolimeri, come risultato delle interazioni idrofobiche.

Al fine di prevedere se la reticolazione del GGm e dei tre copolimeri risultasse fisiologicamente compatibile, è stato studiato il comportamento dei campioni in un mezzo salino con forza ionica paragonabile a quella presente nei fluidi fisiologici. In particolare, è stata utilizzata una soluzione di CaCl_2 0.102 M. Inizialmente sono stati condotti esperimenti di *strain sweep* per valutare la regione di viscoelasticità lineare. A causa della diversa percentuale di *strain* applicata per eseguire l'analisi (diversa regione di viscoelasticità lineare) non è stato possibile effettuare un confronto diretto tra i campioni non reticolati e quelli reticolati. Nonostante ciò è possibile notare come

la presenza di cationi bivalenti abbia influenzato i valori dei moduli G' e G'' dei campioni (Figura 39).

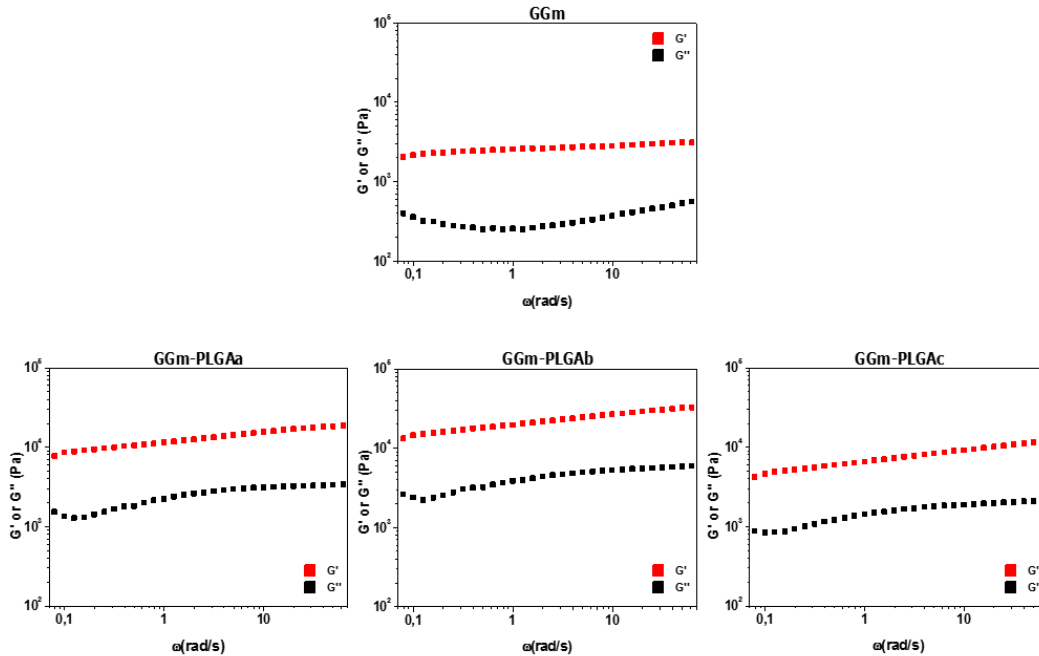


Figura 39. Prove di frequency sweep del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA reticolati in CaCl_2 0.102 M. Gli esperimenti sono stati eseguiti all'1% di strain

I valori di G' e G'' dei copolimeri GGm-PLGA ottenuti sono superiori a quelli del GGm (G' pari a ~ 2 kPa nell'intervallo di frequenza analizzato), ma non sembrano dipendere dal grado di funzionalizzazione, al contrario, il GGm-PLGAc mostra valori leggermente inferiori rispetto a quelli dei campioni meno funzionalizzati.

Per il GGm-PLGAa il valore di G' è compreso tra 8 e 19 kPa, mentre per il GGm-PLGAb è pari a 13-33 kPa (nell'intervallo di frequenza 0.1-100 rad/sec), suggerendo così un contributo significativo, dovuto all'aggregazione idrofobica, alla resistenza degli idrogeli, a seguito della reticolazione con ioni Ca^{2+} . Il G' del GGm-PLGAc, invece, è compreso tra 4 e 12 kPa. Questo valore si può giustificare ipotizzando che un aumento della derivatizzazione in PLGA si traduca in un effetto schermante più efficiente dei gruppi carichi del polisaccaride (gruppi carbossilati), riducendo così le interazioni con i cationi inorganici rispetto ai derivati meno funzionalizzati (Rinaudo, 2004). Inoltre, l'effetto più marcato del gruppo idrofobico, nel GGm-PLGAc, stabilizza la struttura a doppia elica delle catene polimeriche, con conseguente minore sensibilità ai cationi rispetto ai copolimeri con un minor grado di derivatizzazione (Ouyang, et al., 2016b; Huang, et al., 2003; Matsukawa & Watanabe, 2007).

3.1.3 Preparazione e caratterizzazione dei films

Al fine di caratterizzare, in via preliminare, le proprietà fisiche dei copolimeri GGm-PLGA, sono stati preparati dei *films* per deposizione delle dispersioni polimeriche a caldo e successivo raffreddamento a temperatura ambiente. Questi sono stati utilizzati per effettuare prove di *swelling* e di idrolisi.

La capacità di rigonfiamento (*swelling*) è un parametro importante per i materiali utilizzabili in applicazioni biomediche. In generale, sia la densità di reticolazione che le repulsioni elettrostatiche influenzano il grado di *swelling* che, nello specifico, diminuisce all'aumentare della densità di reticolazione e aumenta con la presenza di repulsioni elettrostatiche.

In particolare, sia le interazioni idrofobiche che i cationi bivalenti influenzano il grado di *crosslinking* della gomma gelano, con conseguente bassa capacità di *swelling*. Tuttavia, il GGm, a differenza dei copolimeri (Figura 40b), forma gel fragili in presenza di cationi, impedendo così la valutazione del grado di rigonfiamento in DPBS (Figura 40).

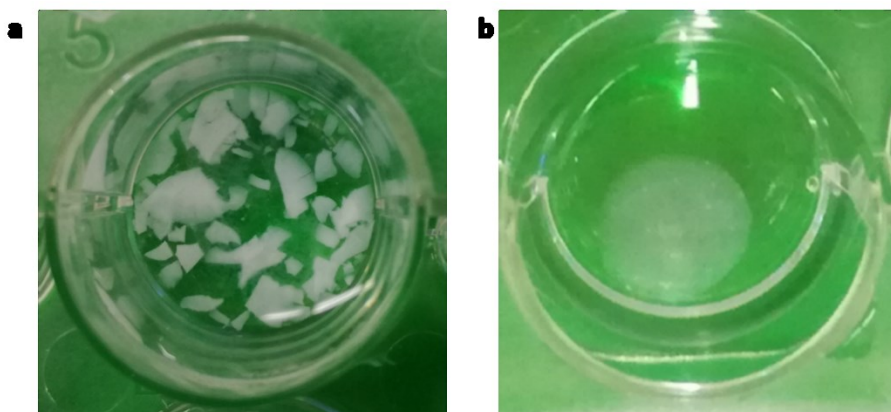


Figura 40. (a) GGm reticolato (mediante CaCl_2 0.102 M) dopo 1 giorno in DPBS. (b) GGm-PLGAc reticolato (mediante CaCl_2 0.102 M) dopo 16 giorni in DPBS

Gli istogrammi dei tre copolimeri hanno evidenziato le differenze tra la capacità di *swelling*, nel tempo, dei campioni non reticolati (Figura 41) e di quelli reticolati (Figura 42).

SWELLING CAMPIONI NON RETICOLATI

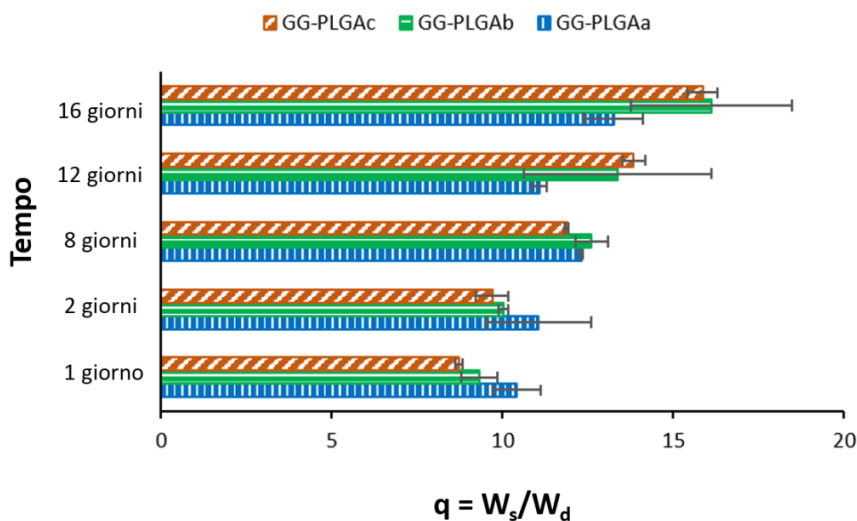


Figura 41. Valori del rapporto in peso di swelling (q) in funzione del tempo per il GGm e i copolimeri GGm-PLGA non reticolati a 37°C in DPBS

SWELLING CAMPIONI RETICOLATI

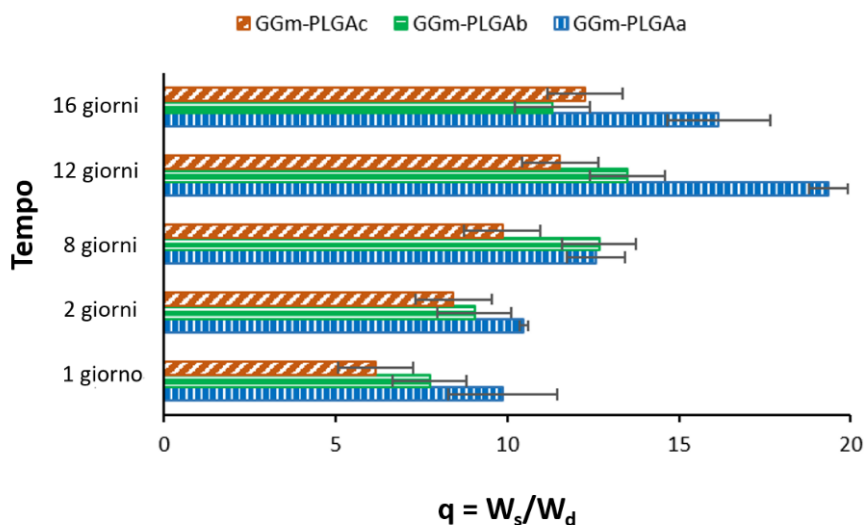


Figura 42. Valori del rapporto in peso di swelling (q) in funzione del tempo per il GGm e i copolimeri GGm-PLGA reticolati (mediante CaCl_2 0.102 M) a 37°C in DPBS

I valori del rapporto in peso di swelling (q) dei campioni non reticolati aumentano linearmente nel tempo. In particolare, dopo 24 ore, il valore di q del GGm-PLGAa risulta essere superiore rispetto a quello del GGm-PLGAc, come risultato delle interazioni idrofobiche che, in quest'ultimo, creano strutture più compatte e respingono le molecole d'acqua presenti al di fuori dell'idrogel. Il valore di q aumenta gradualmente per il GGm-PLGAc, fino a raggiungere un valore pari a 15 il 16° giorno,

mentre il GGm-PLGAa mostra un valore di q pari a 13 ($p < 0.05$). Questo risultato può essere spiegato considerando che il GGm-PLGAc ha subito un rigonfiamento graduale nel tempo a causa di un effetto più marcato dovuto alle interazioni idrofobiche.

L'andamento del grado di *swelling* dei campioni reticolati ha mostrato come questa capacità sia influenzata da molti fattori come, ad esempio, la presenza, ed eventualmente la natura (concentrazione, carica), dei cationi nel mezzo.

Dal momento che il DPBS non contiene cationi bivalenti, si può verificare lo scambio di ioni Ca^{2+} , presenti nei campioni reticolati, con i cationi monovalenti del DPBS, con conseguente rilassamento della struttura polimerica, permettendo così la diffusione del mezzo all'interno della matrice dell'idrogel e successivo rigonfiamento (LeRoux, et al., 1999).

In particolare, al 12° e 16° giorno i valori di q dei copolimeri reticolati GGm-PLGAb e c sono risultati inferiori rispetto a quelli del GGm-PLGAa reticolato; inoltre, questi valori di q sono inaspettatamente superiori rispetto a quelli dei corrispondenti campioni non reticolati, ciò è dovuto ad una probabile frammentazione durante il processo di reticolazione ($p < 0.05$).

È ragionevole ipotizzare che per il copolimero GGm-PLGAa, la repulsione elettrostatica, attribuibile alla perdita del Ca^{2+} dal *network* tridimensionale, sia più considerevole rispetto all'effetto idrofobico. Quest'ultimo contributo, invece, è maggiormente evidente nei copolimeri GGm-PLGAb e c.

Inoltre, l'aumentata forza ionica durante il processo di *crosslinking* causa la desolvatazione dei copolimeri e favorisce le aggregazioni idrofobiche. Questo comportamento determina delle differenze nella capacità di *swelling* tra i derivati reticolati, in particolare tra i copolimeri a e b/c, in accordo con il grado di derivatizzazione.

Sono state, inoltre, effettuate prove di degradazione del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA (reticolati e non reticolati) (Figure 43 e 44) per studiare la stabilità nel mezzo DPBS, a 37°C. Per ciascun intervallo di tempo stabilito, il peso recuperato (finale) dei copolimeri GGm-PLGA aumenta con l'incremento del grado di derivatizzazione in PLGA.

IDROLISI CAMPIONI NON RETICOLATI

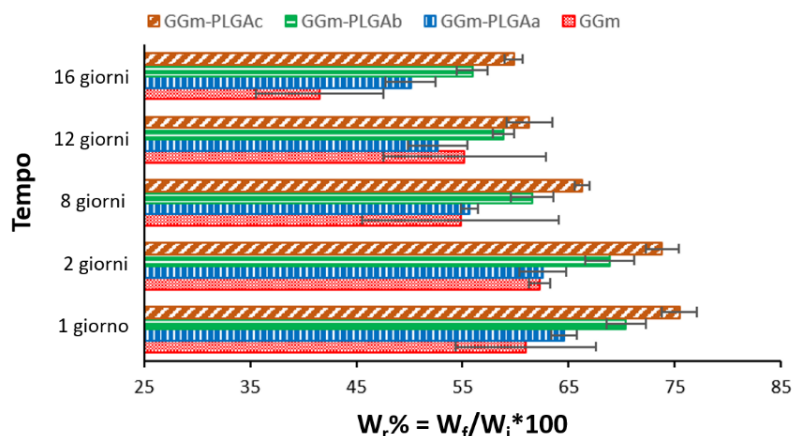


Figura 43. Percentuale di peso recuperato (W_r) in funzione del tempo del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA non reticolati a 37°C in DPBS

IDROLISI CAMPIONI RETICOLATI

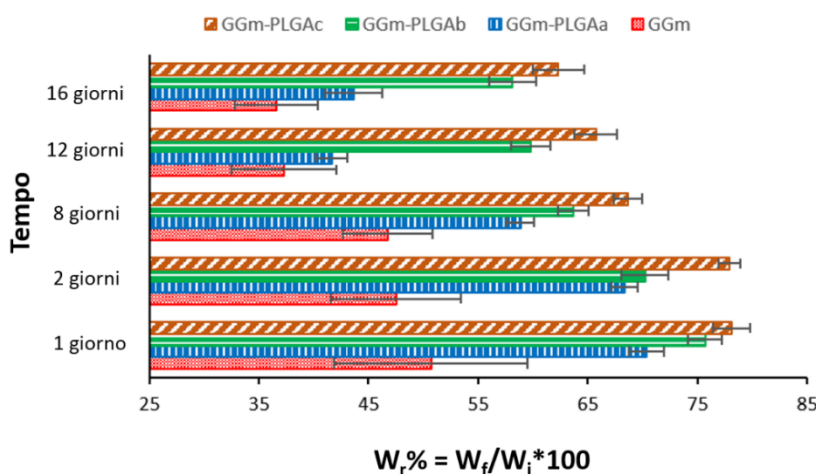


Figura 44. Percentuale di peso recuperato (W_r) in funzione del tempo del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA reticolati (mediante $CaCl_2$ 0.102 M) a 37°C in DPBS

La percentuale in peso recuperato, sia dei campioni non reticolati (Figura 43) che di quelli reticolati (Figura 44), è diminuita linearmente nel tempo, ad eccezione di quella dei campioni di GGm-PLGAa reticolati che, invece, hanno mostrato una drastica riduzione dopo 12 giorni ($p < 0.05$).

E' possibile giustificare questi risultati ipotizzando che le catene di poliestere rallentino il processo di degradazione idrolitica, respingendo l'acqua e permettendo l'ottenimento di un gel più rigido, riducendo così la diffusione dell'acqua e, di conseguenza, la percentuale di degradazione. Pertanto, maggiore è la quantità di PLGA, maggiore è la percentuale in peso recuperato. Per quanto riguarda i campioni

del copolimero GGm-PLGAa reticolati, possibilmente, in seguito allo scambio dei cationi Ca^{2+} con i cationi monovalenti del DPBS, si ottiene una struttura fragile che risulta facilmente permeabile e, quindi, sottoposta in misura maggiore a degradazione idrolitica.

Per studiare l'andamento della degradazione, è stata eseguita l'analisi ATR-FTIR dei residui dei campioni del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA. Gli spettri dei campioni analizzati, reticolati e non reticolati, dopo 1 e 16 giorni, sono mostrati in Figura 45.

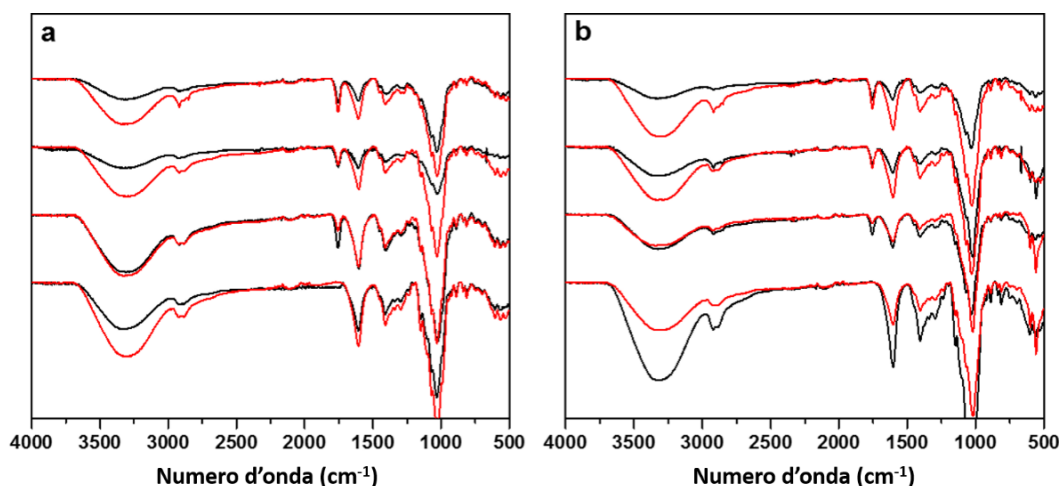


Figura 45. Spettri ATR-FTIR dei residui dei campioni di GGm e GGm-PLGA (a) non reticolati e (b) reticolati (mediante CaCl_2 0.102 M) dopo 1 giorno (in nero) e dopo 16 giorni (in rosso). Dal basso verso l'alto: GGm, GGm-PLGAa, GGm-PLGAb e GGm-PLGAc

In particolare, dopo 16 giorni, la banda a 3300 cm^{-1} e il picco a 1600 cm^{-1} risultano più ampi rispetto a quelli al 1° giorno di degradazione; mentre, il picco a 1750 cm^{-1} è lentamente diminuito contestualmente all'aumento del picco a 1600 cm^{-1} e, come previsto, la differenza tra i due picchi è risultata più evidente per il GGm-PLGAa. Questi cambiamenti indicano la degradazione degli anelli polisaccaridici della gomma gellano e la progressiva idrolisi della catena laterale del poliestere che avviene per ogni campione, sia reticolato che non reticolato, nei tempi considerati.

Le interazioni idrofobiche sono fondamentali per ridurre la degradazione idrolitica della gomma gellano, dunque, cambiando il grado di derivatizzazione, tali interazioni potrebbero essere potenzialmente sfruttate per controllare la degradazione del materiale.

3.1.4 Studi di citocompatibilità *in vitro*

Al fine di valutare la possibilità di impiego del GGm e dei copolimeri GGm-PLGA in applicazioni di biostampa, sono stati condotti studi di citocompatibilità *in vitro*. In particolare, fibroblasti 3T3 sono stati adoperati come linea cellulare modello.

La vitalità è stata valutata attraverso il saggio MTS. In particolare, i risultati ottenuti hanno mostrato un'elevata vitalità cellulare e un contributo significativo, da parte delle catene di PLGA, nell'incremento del profilo di citocompatibilità dei copolimeri GGm-PLGA rispetto al GGm (Figura 46). Più precisamente, dopo 24 ore, circa il 70% delle cellule presenti nel GGm erano vitali, mentre quelle presenti nei copolimeri GGm-PLGA hanno raggiunto valori di vitalità compresi tra l'80 e il 90%; dopo 48 ore sono stati ottenuti risultati simili ($p < 0.05$).

La biocompatibilità di un biomateriale dipende fortemente dalle interazioni interfacciali tra le cellule e il biomateriale. L'equilibrio idrofilia/idrofobicità ha un ruolo importante, influenzando l'adsorbimento delle proteine. In particolare, le porzioni idrofobiche possono legare le proteine sulla superficie del materiale esponendo i residui idrofobici interni che influenzano la risposta biologica di un biomateriale. Inoltre, l'effetto della carica superficiale influenza fortemente la risposta cellulare. Il PLGA idrofobico può indurre uno schermo efficiente dei gruppi carichi negativi del polisaccaride, come confermato dalle analisi reologiche, con effetto positivo sulla vitalità cellulare (Chen, et al., 2018c; Ferrari, et al., 2019).

Per confermare qualitativamente il test MTS, le cellule sono state trattate con arancio di acridina (AO) ed etidio omodimero (EthD-1). Si tratta di due fluorocromi che consentono di discriminare le cellule vitali da quelle morte. In particolare, l'arancio di acridina è in grado di intercalarsi a livello del DNA emettendo una fluorescenza verde. Contemporaneamente, può legarsi all'esterno della singola elica di RNA emettendo una fluorescenza rossa; mentre l'etidio omodimero riesce a penetrare soltanto nelle cellule che presentano una membrana plasmatica danneggiata e va ad intercalarsi a livello della doppia elica del DNA, emettendo così una fluorescenza rossa nelle cellule non vitali.

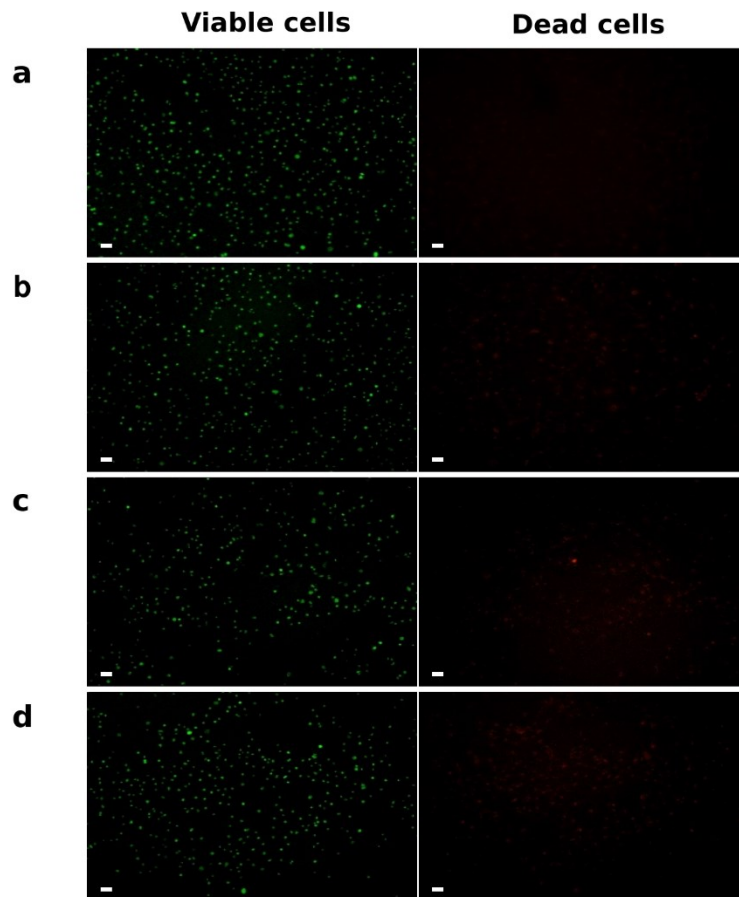
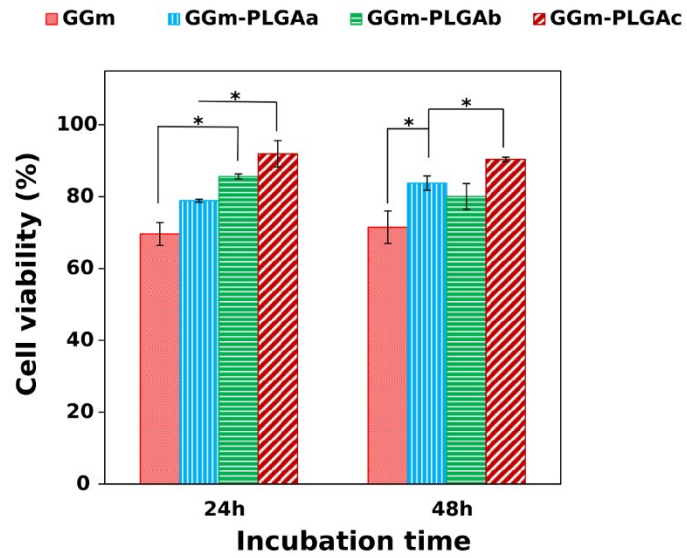


Figura 46. In alto: risultato del saggio MTS su fibroblasti murini 3T3 incubati con il GGm (rosa) e i copolimeri GGm-PLGAa (azzurro), GGm-PLGAb (verde) e GGm-PLGAc (bordeaux) dopo 24 ore e 48 ore di incubazione. I risultati sono espressi come percentuale rispetto alle cellule di controllo; in basso: Immagini in fluorescenza dei fibroblasti murini 3T3 marcati con AO/EthD-1 incubati per 24 ore con (a) GGm e con i copolimeri (b) GGm-PLGAa, (c) GGm-PLGAb e (d) GGm-PLGAc (scale bar: 50µm)

Le immagini a fluorescenza dei fibroblasti marcati con AO/EthD-1 sono mostrati in Figura 46. Come si può osservare, la maggior parte delle cellule hanno mantenuto la loro vitalità, solo sporadicamente è stata riscontrata la presenza di cellule non vitali.

3.1.5 3D Bioprinting: Yield stress e Recovery time

Nel *bioprinting*, le proprietà reologiche del materiale svolgono un ruolo importante e, oltre al comportamento pseudoplastico, adeguati valori di *yield stress* sono necessari (Blaeser, et al., 2016). Con *yield stress* di un materiale si intende lo sforzo di taglio minimo che deve essere superato per far fluire un materiale (Barnes, 1999; Møller, et al., 2006; Nguyen & Boger, 1992). Il successo di un bioinchiostro, in termini di fedeltà di forma, è stato associato al suo valore di *yield stress*, indice della resistenza alla deformazione (Malda, et al., 2013). Come regola generale, i bioinchiostri che presentano valori di *yield stress* superiori a 100 Pa offrono un vantaggio importante per la stampa ad estrusione.

Per questo studio, è stato selezionato il copolimero GGm-PLGAb e le sue prestazioni sono state testate in diverse miscele acqua/DPBS e lo *yield stress* è stato determinato dal punto in cui la viscosità si discostava dalla linearità (Figura 47a). La dispersione acquosa del copolimero selezionato (5% p/v) presenta un valore di *yield stress* di circa 80 Pa. Per le miscele con DPBS, questo valore cresce con un aumento della quantità di DPBS.

In particolare, i valori di *yield stress* nelle miscele 60/40, 50/50, 25/75 e 0/100 acqua/DPBS sono rispettivamente di 450 Pa, 550 Pa, 800 Pa e 1 kPa. L'aumento dello *yield stress* in DPBS è dovuto alle interazioni con i cationi presenti e al processo di desolvatazione della porzione idrofobica (causato da una maggiore forza ionica) (Figura 47b).

Come accennato in precedenza, diversi sono i requisiti da considerare, e, nello sviluppo di un nuovo bioinchiostro per l'ingegneria tessutale, è necessaria la combinazione dei requisiti già elencati con la capacità del materiale di recuperare rapidamente il valore dei moduli iniziale (Abbadessa, et al., 2016a).

Un *bioink* ideale, per consentire la realizzazione di costrutti in grado di mantenere la forma conformemente al modello digitale, quando sottoposto ad elevati sforzi di taglio, dovrebbe essere in grado di fluire in modo da favorire l'estrusione; mentre, una volta depositato, dovrebbe riacquistare la viscosità originale nel minor tempo possibile (Melchels, et al., 2014). Nonostante i pareri contrastanti riguardo un'incapsulazione

delle cellule più omogenea con un recupero lento (Peak, et al., 2018); un *bioink* con un tempo di recupero rapido è preferibile da impiegare per le applicazioni di biostampa in quanto garantisce alta fedeltà di forma al modello digitale ed evita la sedimentazione delle cellule incapsulate (Wilson, et al., 2017; Wang, et al., 2018a).

Pertanto, al fine di studiare il comportamento del fluido durante un normale processo di stampa, sono stati eseguiti test di recupero dei moduli elastico e viscoso (*recovery test*). In particolare, la Figura 47c mostra il recupero dei moduli del copolimero GGm-PLGAb, disperso in miscela acqua/DPBS 60:40, sottoposto a basse e ad alte sollecitazioni.

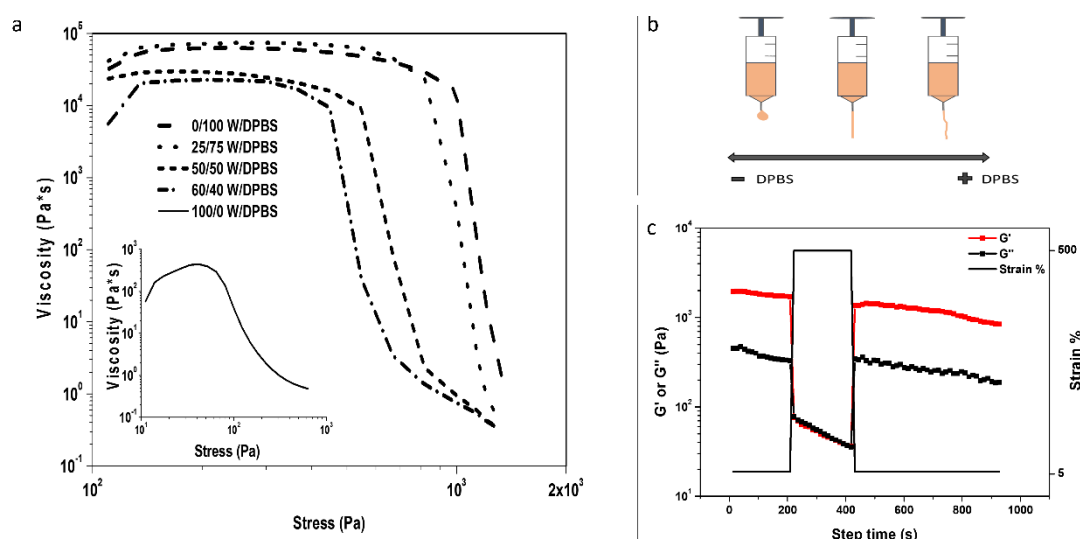


Figura 47. (a) Valori di viscosità in funzione dello stress applicato del copolimero GGm-PLGAb nelle miscele acqua/DPBS selezionate; (b) influenza del DPBS sulla deposizione del filamento; (c) moduli elastico e viscoso del GGm-PLGAb disperso in miscela acqua/DPBS (60:40) a basse (5%) e ad alte (500%) percentuali di strain

Nello specifico, quando è stata applicata una deformazione elevata (500%) al campione, è stata osservata una riduzione del modulo elastico iniziale, da 2 kPa a 75 Pa, per poi diminuire parallelamente al modulo viscoso fino a 36 Pa entro 200 s, mostrando un comportamento fluido. Invece, quando il campione è stato sottoposto nuovamente ad una bassa deformazione (5%), il modulo di conservazione ha recuperato, quasi immediatamente, l'80% del valore iniziale, indicando, dunque, un rapido recupero quando la deformazione è stata rimossa.

In generale, per garantire la stabilità del costruito dopo il processo di stampa e per sostenere il peso degli strati successivi, è raccomandabile l'impiego di un *bioink* che presenti un tempo di recupero relativamente rapido.

3.1.6 Prove di stampa e incorporazione delle cellule

A seguito dello sviluppo e della caratterizzazione del biomateriale, sono stati eseguiti dei test per studiarne il comportamento durante la fase di estrusione. In particolare, sono state effettuate delle prove preliminari di stampa in modo da verificare l'effettiva stampabilità del *bioink* e la risoluzione dei costrutti ottenuti.

Inizialmente il bioinchiostro privo di cellule è stato trasferito all'interno di una siringa per essere testato dapprima manualmente e, successivamente, con la stampante ad estrusione. Nello specifico, è stata utilizzata la stampante BioX (CELLINK) e la forma selezionata per la stampa è stata una griglia di dimensioni pari a 10 x 10 x 3 mm.

E' noto che il tipo di materiale impiegato, la pressione esercitata, la velocità di stampa e, soprattutto, le dimensioni dell'ugello sono fattori che influenzano notevolmente la risoluzione del costrutto stampato (Ozbolat & Hospodiuk, 2016). Pertanto, al fine di individuare i valori ottimali di stampa, sono stati variati diversi parametri, quali, ad esempio, pressione e velocità di estrusione.

Per effettuare le prove di stampa è stato selezionato il copolimero GGm-PLGAb grazie alle sue particolari caratteristiche. In particolare, il campione è stato disperso in diverse miscele di acqua e DPBS, in modo da selezionare la dispersione che presentasse il miglior comportamento durante la fase di estrusione. Le condizioni ottimali individuate durante queste prove di stampa sono riportate in Tabella 4.

Come previsto, quando il diametro dell'ugello utilizzato diminuiva, risultava maggiore la pressione da applicare e si aveva un aumento della risoluzione. L'estrusione della dispersione del copolimero in acqua non ha permesso di ottenere un filamento continuo, bensì si ottenevano delle goccioline. Invece, con l'aggiunta crescente di DPBS nella fase disperdente, la risoluzione inizialmente aumentava in accordo con i valori di *yield stress* (Figura 47b); d'altra parte, le formulazioni in miscela acqua/DPBS 25:75 e 0:100 risultavano troppo viscosi, causando la formazione di filamenti discontinui e strutture incomplete. Inoltre, erano richiesti alti valori di pressione e una bassa velocità di estrusione, condizioni nocive per l'incapsulamento e la sopravvivenza delle cellule.

Tabella 4. Differenti condizioni utilizzate per le prove di stampa del campione GGm-PLGAb

Campione	Acqua/DPBS (v/v)	Ago (Gauge)	Pressione dell'aria (kPa)	Temperatura (°C)	Velocità di stampa (mm/s)	Note
GGm-PLGAb	100:0	22	10	37	15	Non stampabile, troppo fluido
	-	27	25	37	10	Bassa risoluzione, non abbastanza viscoso da mantenere la forma
GGm-PLGAb	60:40	22	30	37	5	Bassa risoluzione
	-	25	30	37	4	Risoluzione intermedia
	-	27	50	37	2.5	Buona risoluzione
	-	27	90	37	5	Buona risoluzione
GGm-PLGAb	50:50	25	90	37	10	Risoluzione intermedia
	-	25	90	37	7.5	Buona risoluzione
	-	27	110	40	7.5	Buona risoluzione, richiesti alti valori di pressione
GGm-PLGAb	25:75	25	60	40	-	Non stampabile
	-	25	90	40	7	Risoluzione intermedia, filamento interrotto
	-	25	110	40	10	Risoluzione intermedia, filamento interrotto
	-	27	125	40	8.5	Difficile da estrarre
GGm-PLGAb	0:100	22	65	40	8	Stampa incompleta, filamento interrotto
	-	25	130	40	7.5	Stampa incompleta, filamento interrotto
	-	27	200	40	-	Non stampabile

Come descritto in precedenza, un aumento del DPBS determina un aumento del valore di *yield stress*, migliorando la stampabilità, ma con l'aumento di questo valore, superiore a 800kPa (nella miscela 25/75), l'estrusione era difficile con possibile ostruzione dell'ago.

In conclusione, le formulazioni migliori, in termini di stampabilità, erano le dispersioni del copolimero GGm-PLGAb in miscela acqua/DPBS 60:40 e 50:50. In particolare, è stata selezionata la dispersione in miscela 60:40 in quanto ha mostrato un'ottima risoluzione a valori di pressione inferiori rispetto a quelli necessari per l'estrusione della dispersione in miscela 50:50.

In sintesi, i parametri migliori per la stampa sono stati: pressione dell'aria 50 kPa, velocità di stampa 2.5 mm/s, ago 27 GG (Tabella 4).

In Figura 48 sono presenti alcuni costrutti stampati di GGm-PLGAb.

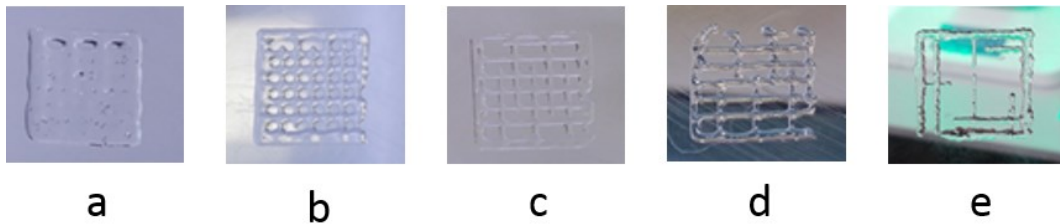


Figura 48. Esempi di costrutti di GGm-PLGAb stampati a diverse condizioni: (a) pressione dell'aria 25 kPa, velocità di stampa 10 mm/s, ago 27 GG, 37°C; (b) pressione dell'aria 50 kPa, velocità di stampa 2.5 mm/s, ago 27 GG, 37°C; (c) pressione dell'aria 110 kPa, velocità di stampa 7.5 mm/s, ago 27 GG, 40°C; (d) pressione dell'aria 110 kPa, velocità di stampa 10 mm/s, ago 25 GG, 40°C; (e) pressione dell'aria 130 kPa, velocità di stampa 7.5 mm/s, ago 25 GG, 40°C

Il potenziale uso di questo sistema come supporto cellulare è stato valutato *in vitro* per 7 giorni mediante incapsulamento di fibroblasti murini 3T3 o condrociti articolari primari bovini (1×10^6 cellule/ml) negli idrogeli. Le cellule sono state incapsulate con successo nel campione disperso nella miscela 60/40 risultando, come mostrato in Figura 49, uniformemente distribuite (Cidonio, et al., 2019; Schwartz, et al., 2020). Dopo la stampa, parte dei costrutti cellulari sono stati incubati in un bagno CaCl_2 da 0.102 M per migliorare la stabilità post-stampa. In seguito, per garantire che sia la fase di stampa che la successiva reticolazione non fossero dannosi per le cellule, la vitalità è stata valutata con AO e Ethd-1 per le strutture trattate e non con CaCl_2 .

Sebbene il saggio per i campioni non reticolati per entrambe le linee cellulari confermi che la maggior parte delle cellule erano vitali a 1 e 7 giorni dopo il processo di stampa, un numero moderato di cellule non vitali è stato trovato nei campioni reticolati. Inoltre, anche se la reticolazione degli *scaffolds* con CaCl_2 spesso migliora le proprietà meccaniche e permette di ottenere strutture 3D stabili (Naghieh, et al., 2018), le cellule incapsulate possono essere influenzate negativamente da questo processo. In particolare, l'influenza degli ioni calcio, utilizzati come agenti reticolanti durante e dopo il processo di biofabbricazione, sulla vitalità cellulare è stata ben studiata da Cao e coll. variando sia la concentrazione di ioni calcio sia il tempo di incubazione (Cao, et al., 2012). In questo lavoro gli autori hanno mostrato che l'esposizione delle cellule a questi ioni può causare una significativa riduzione della vitalità cellulare, motivando questi risultati come conseguenza di un effetto osmotico e il ruolo degli ioni di calcio come segnale di morte cellulare programmata. Tuttavia, selezionando i parametri appropriati, la reticolazione con calcio consente l'incapsulamento delle cellule senza perdita della vitalità cellulare (Swioklo, et al., 2017).

Inoltre, questo può essere attribuito alla contrazione della matrice di idrogel in presenza di calcio. Questo processo probabilmente limita la penetrazione del mezzo nella matrice dell'idrogel, con conseguente isolamento delle cellule da ossigeno e nutrienti.

Ulteriori prove dell'uso del copolimero GGm-PLGAb come potenziale *bioink* sono state confermate dalle immagini SEM (Figura 49a-b), in quanto i condrociti coltivati mantengono la tipica forma rotonda per le 2 settimane del periodo di coltura cellulare.

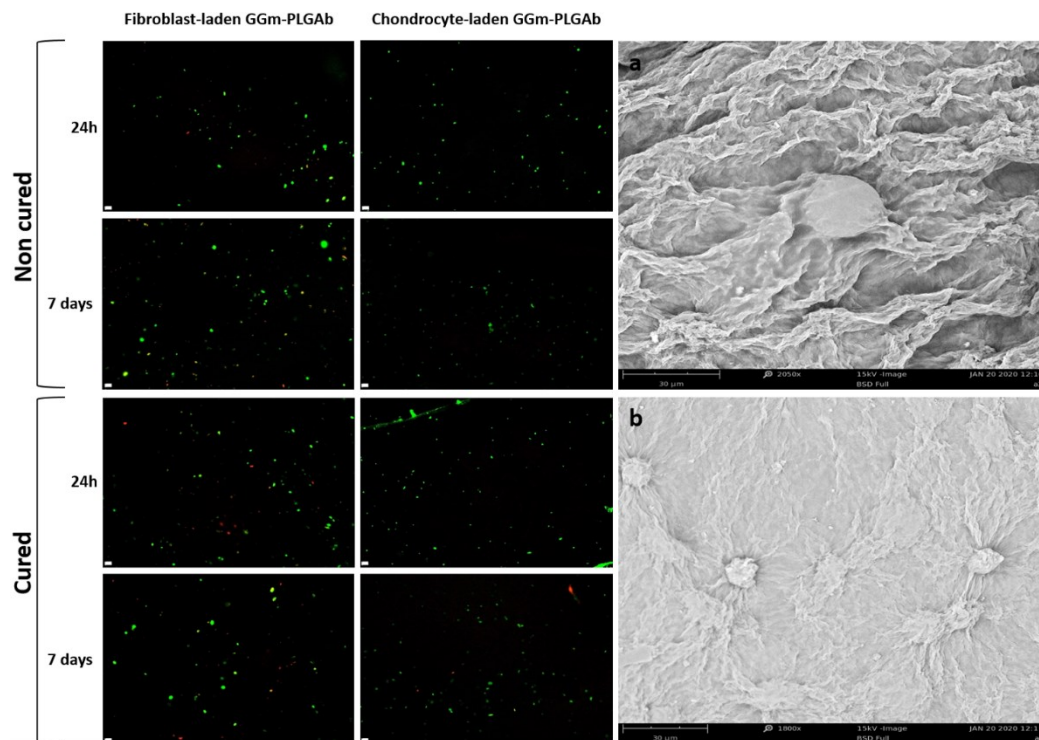


Figura 49. Risultati del saggio *Live and Dead* dei campioni reticolati e non di GGm-PLGAb caricati con fibroblasti e condrociti a 24h e 7giorni (scale bar: 50µm) e immagini SEM dei campioni (a) non reticolati e (b) reticolati di GGm-PLGAb dopo 15 giorni

La colorazione con AO e Ethd-1 permette la distinzione non solo tra le cellule vitali e non, ma anche tra stadio apoptotico precoce e tardivo rilevando cambiamenti morfologici di base delle cellule. Come mostrato in Figura 50 non è stata rilevata alcuna apoptosi significativa nei campioni non reticolati, viceversa nei reticolati sono state trovate poche cellule apoptotiche in fase precoce e avanzata (Liu, et al., 2015).

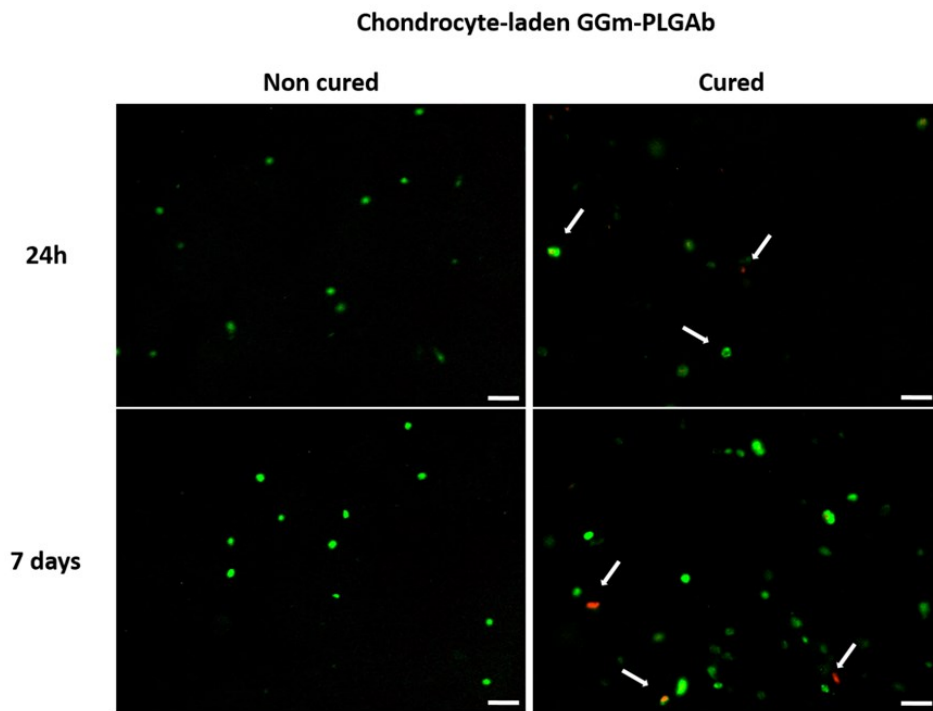


Figura 50. Immagini in fluorescenza dei campioni reticolati e non di GGm-PLGAb caricati con condrociti trattati con AO/EthD-1 a 24h e 7giorni (scale bar: 50 μ m). Le cellule in differenti stadi di apoptosi sono indicate con delle frecce

3.2 Produzione, caratterizzazione chimicofisica, reologica e biologica di un *bioink* a base di un derivato amminico della gomma gellano

3.2.1 Sintesi e caratterizzazione del polimero GG-EDA

Al fine di formulare un nuovo *bioink* per biostampa 3D, si è scelto di utilizzare un derivato etilendiamminico della gomma gellano (GG-EDA) funzionalizzandolo con O-[2-(6-Oxocaproilammino) etil]-O'-metilpolietilen glicole 2000 (di seguito indicato come PEG-Aldeide). In particolare, è stato scelto tale derivato, poiché, oltre a possedere le già citate vantaggiose proprietà della gomma gellano, in particolare una gelificazione termotropica e ionotropica, la presenza dei gruppi amminici consente di ottenere idrogeli con proprietà chimicofisiche migliori rispetto alla gomma gellano di partenza grazie alla formazione di interazioni inter e intramolecolari tra i gruppi amminici protonati dell'EDA e i gruppi carbossilati del residuo di acido glucuronico (Fiorica, et al., 2020).

Inoltre, la presenza di gruppi amminici potrebbe, per quanto riportato in letteratura (de Oliveira, et al., 2020), aumentare l'adesività cellulare e consentire la funzionalizzazione dell'idrogel con altre molecole in grado di influenzarne le proprietà chimicofisiche e biologiche.

Tuttavia, se da un lato è vero che la presenza dei gruppi amminici migliora le proprietà chimicofisiche degli idrogeli, è altrettanto vero che i legami intra e intermolecolari causano un aumento della viscosità delle dispersioni e dei moduli elastico e viscoso, riducendone la siringabilità e, quindi, la processabilità mediante tecniche di biostampa 3D.

Per tale motivo, si è scelto di funzionalizzare ulteriormente il GG-EDA a livello del gruppo amminico, al fine di ottenere un polimero utilizzabile per la formulazione di *bioinks*, in quanto in tal modo si dovrebbero ridurre il numero delle sopracitate interazioni, essendo parte dei gruppi amminici impegnati nella funzionalizzazione, con conseguente riduzione della viscosità e dei moduli elastico e viscoso.

Relativamente alla sintesi del GG-EDA, è stato utilizzato un derivato a basso peso molecolare della gomma gellano, ottenuto mediante degradazione della stessa in ambiente alcalino, capace di formare una dispersione acquosa meno viscosa rispetto alla gomma gellano di partenza.

Nello specifico, anzitutto, si è proceduto con la degradazione della gomma gellano, al fine di ottenere il derivato a più basso peso molecolare e il suo sale di

tetrabutylammonio (GG-TBA). Quindi è stato sintetizzato GG-EDA tramite l'attivazione preliminare dei gruppi ossidrilici primari delle unità ripetitive del GG-TBA con 4-NPBC, seguita dalla sostituzione nucleofila da parte dell'etilendiammina (EDA). In particolare, questa reazione, che porta alla funzionalizzazione dei gruppi ossidrilici primari delle unità ripetitive del GG-TBA con EDA attraverso la formazione di legami carbammici, è stata effettuata in DMSO_a secondo la procedura riportata da Fiorica e coll (Fiorica, et al., 2020).

Il polimero ottenuto è stato caratterizzato mediante analisi ¹H-NMR. Lo spettro (Figura 51), in particolare, mostra un picco a δ 2.68 attribuibile ai protoni metilenici vicinali al gruppo amminico libero dell'EDA. Il grado di funzionalizzazione in EDA, calcolato paragonando l'integrale del picco a δ 2.68 con quello a δ 1.20 dei protoni metilici del ramnosio, è del 41±5% circa.

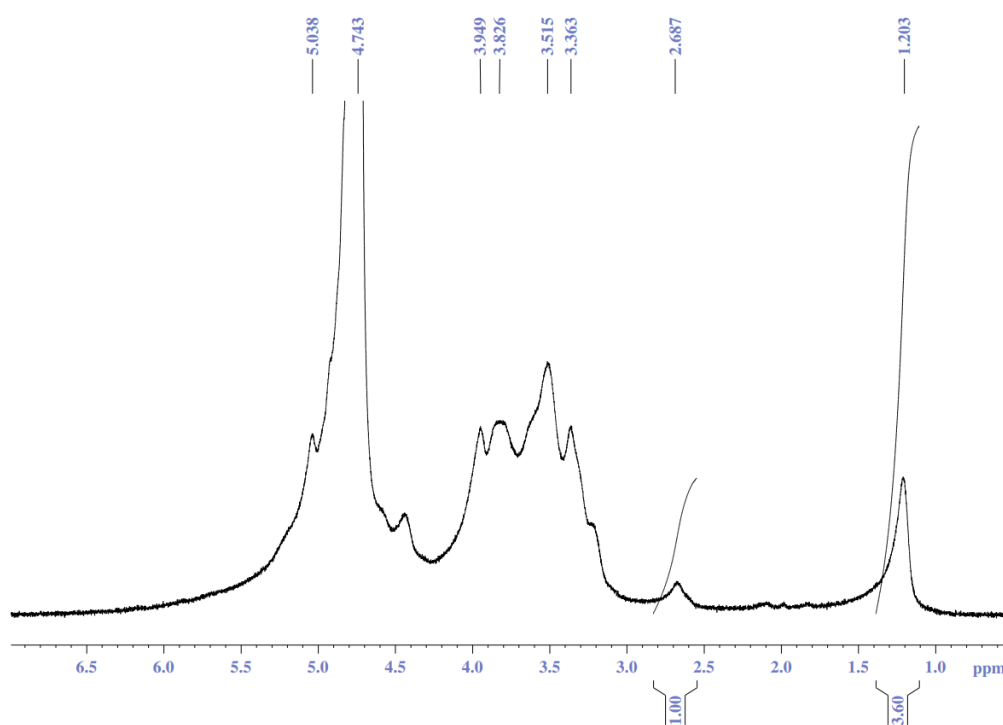


Figura 51. Spettro ¹H-NMR del GG-EDA

Al fine di utilizzare il polimero per la preparazione delle dispersioni per la stampa, il GG-EDA è stato disperso in acqua bidistillata e il pH di tale dispersione è stato aggiustato, mediante HCl 1N, a 6.5, essendo questo pH favorevole per la formazione del legame imminico nella successiva reazione tra il GG-EDA e il PEG-Aldeide. Quindi il prodotto è stato isolato mediante *freeze-drying* e utilizzato per la successiva miscelazione con PEG-Aldeide e per la preparazione della dispersione per la stampa.

3.2.2 Preparazione e caratterizzazione delle dispersioni per la stampa (*inks*)

Il PEG è un polimero sintetico molto usato in campo farmaceutico-tecnologico e nell'ingegneria tissutale per la sua elevata idrofilia, l'assenza di tossicità e di immunogenicità e la sua citocompatibilità.

In particolare, in questo lavoro è stato utilizzato il PEG-Aldeide, al fine di sfruttare la formazione di un legame imminico tra il gruppo aldeidico del PEG-Aldeide e il gruppo amminico del GG-EDA, poiché il carattere dinamico di tale legame consente di modificare temporaneamente le caratteristiche chimico-fisiche del GG-EDA per consentirne l'utilizzo come *bioink*. Anche se il PEG-aldeide è stato utilizzato per modificare polimeri con gruppi $-NH_2$ nella loro catena, come il chitosano, solitamente le procedure prevedono una riduzione del legame imminico (Ailincăi, et al., 2020; Bhattarai, et al., 2005). In questo caso il PEG è stato selezionato con lo scopo di migliorare il processo di stampa, per i benefici prima descritti dei legami dinamici, per poi recuperare le proprietà iniziali del GG-EDA. Il PEG-Aldeide è stato scelto, dunque, per bloccare in maniera temporanea e reversibile i gruppi amminici. Esso serve a modulare le proprietà del GG-EDA, solamente, ai fini della stampa, senza, però, perderle in maniera definitiva una volta formati gli idrogeli. La sua funzione è, fondamentalmente, quella di rendere il GG-EDA processabile mediante biostampa 3D, per poi venire, completamente, allontanato.

Per quanto riguarda la preparazione dell'*ink*, il GG-EDA, ottenuto come descritto nel paragrafo precedente, è stato disperso a caldo al 3% p/v in acqua bidistillata, quindi è stato miscelato, poco prima della stampa, con una soluzione di PEG-Aldeide, anch'essa al 3% p/v. La Figura 52a-b mostra rispettivamente lo schema di reazione e la modalità di miscelazione utilizzata. Nello specifico sono state aggiunte due diverse quantità di PEG-Aldeide, corrispondenti, in moli al 20% e al 40% dei gruppi amminici del GG-EDA in modo da ottenere gli *ink* denominati A (con una minore quantità di PEG-Aldeide) e B (con una maggiore quantità) rispettivamente.

Tale scelta è stata operata per meglio valutare la risposta nelle proprietà reologiche alla sottrazione temporanea di un diverso numero di gruppi amminici impegnati nel legame.

Gli *inks* ottenuti, aventi una concentrazione del polimero GG-EDA-PEG pari al 3% p/v, hanno, anzitutto, mostrato caratteristiche macroscopiche di fluidità differenti rispetto ad una dispersione del GG-EDA alla stessa concentrazione, in maniera

proporzionale alla quantità di PEG-aldeide presente, come dimostrato dal test dell'inversione del tubo (Figura 52c).

Questo risultato ha confermato l'iniziale ipotesi consentendo di ottenere un polimero in grado di essere meglio processato con stampante 3D e di conseguenza permettendo una più facile incorporazione cellulare nella formulazione del *bioink*.

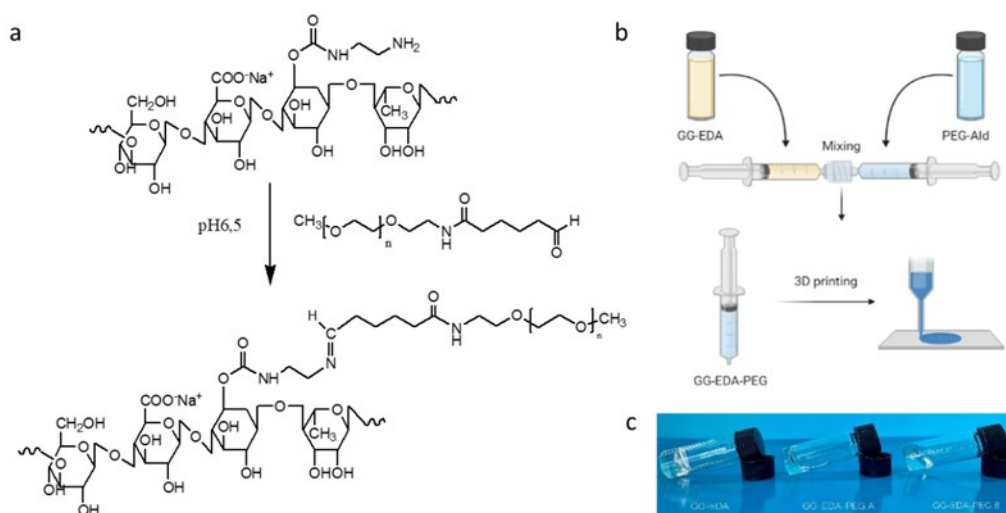


Figura 52. (a-b) Schema di reazione e produzione del GG-EDA-PEG; (c) Test di inversione del tubo delle dispersioni al 3% p/v di GG-EDA, GG-EDA-PEG A e B

Gli *inks* di GG-EDA-PEG ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi ATR-FTIR e $^1\text{H-NMR}$.

Per quanto riguarda l'analisi ATR-FTIR, effettuata su campioni essiccati tramite *freeze drying*, sono stati confrontati gli spettri dei derivati GG-EDA-PEG (A e B), del GG-EDA e del PEG-Aldeide (Figura 53).

È bene sottolineare che, a causa della sovrapposizione di numerosi picchi negli spettri del GG-EDA e del PEG-Aldeide, questa analisi risulta essere poco diagnostica. Tuttavia, soprattutto per il derivato GG-EDA-PEG B, è possibile apprezzare picchi tipici del PEG a 2876 cm^{-1} (stiramento C-H) e 1102 cm^{-1} (stiramento C-O) con un'intensità significativamente ridotta rispetto al PEG come risultato del legame con il GG-EDA. Inoltre la presenza nello spettro del *ink* B dei picchi a 1280 , 947 , e 843 cm^{-1} attribuibili al PEG e la contemporanea scomparsa del picco del gruppo aldeidico del PEG-Aldeide a 1720 cm^{-1} , per entrambi gli *inks*, fa supporre un avvenuto legame. Tuttavia, non è possibile osservare l'eventuale presenza del picco del gruppo

imminico, a causa di una sovrapposizione con i picchi caratteristici della gomma gellano.

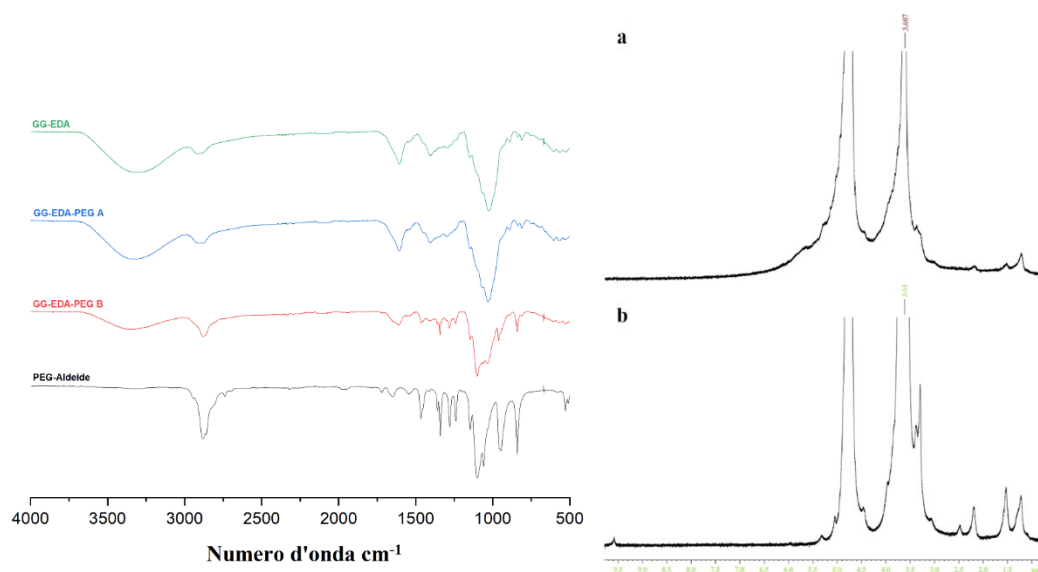


Figura 53. (a sinistra) Spettri ATR-FTIR di GG-EDA, GG-EDA-PEG (A e B) e PEG-Aldeide; (a destra) spettri $^1\text{H-NMR}$ dei polimeri GG-EDA-PEG A (a) e B (b)

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei due polimeri, riportati in Figura 53 a e b, mostrano picchi a δ 3.6 relativo al CH_2 , δ 1.55 ($\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), δ 2.15 NHCOCH_2 del PEG e il picco a δ 1.2 relativo al CH_3 della gomma gellano. Inoltre mostrano una riduzione del picco a δ 2.5 dell'EDA rispetto a quello del GG-EDA, nonché, specialmente nel caso del derivato A, l'avvenuta formazione del legame imminico, evidenziata dall'assenza del picco del protone aldeidico CHO del PEG a circa δ 9.8, ancora visibile nello spettro del derivato B, in quanto, verosimilmente, non tutto il PEG-Aldeide aggiunto è coinvolto nel legame, probabilmente a causa della natura dinamica di questo.

3.2.3 Caratterizzazione reologica degli inks

L'analisi reologica può fornire informazioni quantitative sulla stampabilità quali le forze richieste per l'estrusione, l'impatto che queste avranno sulla vitalità cellulare e sul comportamento di recupero post-estrusione. Piccoli cambiamenti nella composizione di un *bioink* o nelle condizioni di stampa possono essere studiati reologicamente.

In questo caso, per valutare la stampabilità dei due *inks* sono state effettuate diverse analisi reologiche sui relativi campioni preparati come indicato nel paragrafo precedente, i cui risultati sono riportati di seguito.

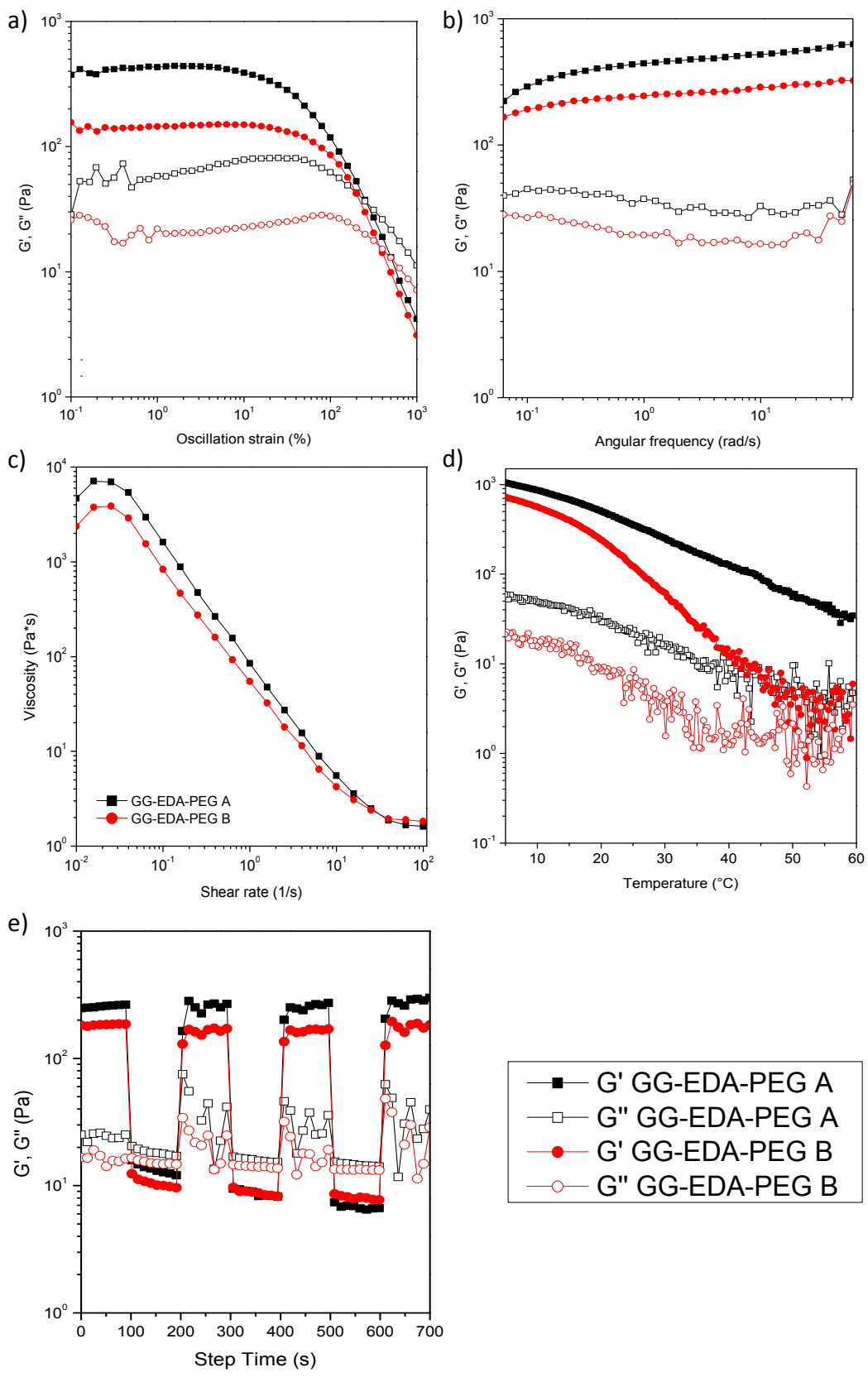


Figura 54. Risultati delle analisi di (a) oscillation amplitude, (b) frequency sweep, (c) flow sweep, (d) temperature sweep ed (e) recovery time effettuate sugli inks A e B

Anzitutto, sono stati effettuati studi di *oscillation amplitude* applicando *strain %* crescenti tra 0.1% e 1000.0%. Queste prove sono state eseguite per studiare il comportamento viscoelastico dei due *inks*, consentendo di individuare l'andamento dei moduli elastico (G') e viscoso (G'') in funzione dello *strain* applicato. In particolare, è stato possibile determinare la regione di viscoelasticità lineare (LVR, a bassi valori di *strain %*) e quella in cui si verifica una inversione di G' e G'' (a più alti valori di *strain %*).

Come si può osservare per entrambi gli *inks*, è possibile notare una differenza tra i valori di G' e quelli di G'' con un valore di G' dell' *ink* A superiore a quello dell' *ink* B per bassi valori di *strain %*, il che indica, oltretutto, che i due *inks* si trovano in uno stato di gel (Figura 54a).

Riguardo G' , i due *inks* presentano una LVR di diversa ampiezza (fino a circa 5% di *strain %* per l' *ink* A e fino a circa 15% per quello B) in cui, appunto, G' si mantiene pressoché costante, per poi diminuire rapidamente all'aumentare dello *strain %* e intersecare la curva del modulo G'' . In particolare, il punto di intersezione tra le curve di G' e G'' di ogni *inks* rappresenta il valore di *strain % critico* cui si verifica una transizione gel-sol e, quindi, lo *strain* applicato fa principalmente fluire la dispersione piuttosto che determinare una sua risposta elastica. Questa transizione avviene a 250% e 360% di *strain %* per l' *ink* A e B rispettivamente come diretta conseguenza della maggiore strutturazione dell'idrogel A data da una minore quantità di PEG presente. Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi di *oscillation amplitude*, sono state eseguite prove di *frequency sweep*. In particolare, è stato scelto un valore di *strain* dell'1%, poiché questo valore si trova all'interno della LVR, per entrambi gli *inks* studiati.

I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 54b. Come è possibile osservare, è stato ottenuto un andamento tipico dei fluidi pseudoplastici, con G' e G'' quasi indipendenti dalla frequenza applicata. In questo caso, l' *ink* A ha mostrato più alti valori di G' e G'' rispetto a quello B. In particolare, per il primo, G' va da 220 a 620 Pa circa, mentre per il secondo da 160 a 320 Pa circa, passando da una frequenza di oscillazione di 0.06283 rad/s ad una oscillazione pari a 62.83 rad/s. Analogamente, G'' va da 40 a 53 Pa circa per l' *ink* A e da 28 a 49 Pa circa per l' *ink* B.

Il comportamento pseudoplastico dei due *inks* è stato confermato tramite studi di *flow sweep* che sono volti a studiare la variazione della viscosità in funzione della velocità con la quale viene applicato lo sforzo di taglio. Come è possibile notare in Figura 54c, entrambi i campioni hanno mostrato una spiccata diminuzione della viscosità

all'aumentare della velocità con la quale lo sforzo di taglio viene applicato con una viscosità, a bassi valori di *shear rate*, maggiore per A rispetto a B (rispettivamente circa 7000 e 3800 Pa×s a 0.015 s⁻¹); questo è relativo alla minore quantità di PEG-Aldeide presente, che impegnando i gruppi amminici del GG-EDA fa sì che vi siano più interazioni con i gruppi carbossilati, andando a rafforzare maggiormente l'architettura dell'idrogel.

Poiché è noto che la temperatura influisce notevolmente sia sulla viscosità che sui moduli viscoelastici dei materiali e, considerando che questi parametri devono essere mantenuti costanti durante tutto il processo di stampa, sono stati condotti degli studi di *temperature sweep* sui due *inks* prodotti. La gomma gellano, così come il suo derivato amminico GG-EDA, a causa della variazione conformazionale *coil-to-helix* indotta dall'abbassamento della temperatura, presenta un andamento dei moduli G' e G'' inversamente proporzionale alla temperatura stessa.

Dai risultati ottenuti si può notare come entrambi gli *inks* studiati mostrino un andamento dei moduli viscoelastici inversamente proporzionale alla temperatura. L'*ink* B mostra un più marcato aumento del valore di G' al diminuire della temperatura mentre l'*ink* A mostra un aumento più graduale del modulo G'. Verosimilmente una minore quantità di PEG-aldeide causa una minore "perturbazione" dell'*entanglement* tra le catene polisaccaridiche di GG-EDA e una minore sensibilità alle variazioni di temperatura (Figura 54d).

La possibilità di controllare i valori dei moduli viscoelastici di un *ink* attraverso variazioni di temperatura risulta essere molto vantaggiosa nel processo di stampa. Ovviamente nel caso della biostampa, questi valori di temperatura devono essere compatibili con la vitalità delle cellule presenti all'interno della dispersione polimerica ossia compreso tra 20 e 40°C.

Infine, sono stati effettuati test di *recovery time*, applicando, alternativamente, *strain* % di bassa e alta entità per mimare il processo di stampa. In Figura 54e sono riportati i risultati del test di *recovery time* per i due *inks* studiati.

Il test ha mostrato che entrambi gli *inks* presentano un buon recupero nei diversi cicli di *strain*% applicati. Per quanto riguarda l'*ink* A all'applicazione di uno *strain* del 500% è stata osservata una riduzione di G' da 370 Pa circa a 20 Pa circa, mentre quando è stato nuovamente applicato uno *strain* dell'1% il G' ha recuperato oltre il 100% del valore iniziale e tale andamento si è mantenuto anche nei cicli successivi.

Anche l'*ink* B, con più PEG, ha mostrato andamenti analoghi, con una riduzione di G' da 200 Pa circa a 10 Pa circa con un'inversione dei moduli all'applicazione di uno *strain* del 500%.

Il fatto che entrambi gli *inks* mostrino un così spiccato recupero fa pensare che possano, una volta stampati, mantenere la forma e consentire l'ottenimento di strutture fedeli al progetto di stampa.

3.2.4 Studi di degradazione

Al fine di caratterizzare le proprietà chimico-fisiche degli idrogeli ottenuti a partire dagli *inks* GG-EDA-PEG A e B, sono stati preparati degli *scaffold* porosi per *freeze-drying* delle dispersioni acquose al 3% p/v preparate come descritto precedentemente. I campioni ottenuti sono stati incubati a 37°C in DPBS a pH 7.4 per favorire la reidratazione e la formazione degli idrogeli. Il peso dei campioni è stato registrato dopo 7, 14 e 21 giorni di incubazione.

Come è possibile notare in Figura 55a, dopo 7 giorni di incubazione gli idrogeli ottenuti dagli *inks* A e B subiscono una perdita in peso rispettivamente pari a $20 \pm 6.95\%$ e $30 \pm 1.24\%$. Questa percentuale rappresenta la quantità di PEG-Aldeide presente nei campioni, quindi fa supporre che la riduzione del peso sia data esclusivamente dall'allontanamento del polimero sintetico. Per confermare questa ipotesi, dopo 7 giorni, i campioni recuperati sono stati analizzati tramite $^1\text{H-NMR}$.

Come è possibile notare in Figura 55b, in entrambi gli spettri si osserva la scomparsa, rispetto al prodotto di partenza (Figura 53), del picco a δ 3.6 attribuibile ai protoni del $-\text{CH}_2-$ della catena poliossietilenica.

Questi risultati corroborano l'ipotesi di partenza che ha previsto di utilizzare il polimero sintetico come eccipiente "sacrificale". Da 7 a 21 giorni, entrambi i campioni hanno mostrato un decremento in peso meno marcato rispetto ai primi 7 giorni di analisi grazie alle proprietà di resistenza idrolitica del derivato amminico della gomma gellano.

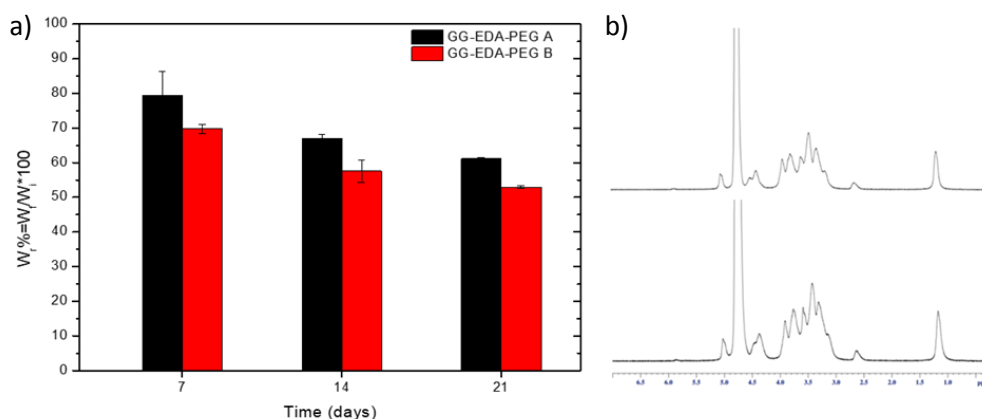


Figura 55. (a) Risultati prove di degradazione: percentuale di peso recuperato (W_r) in funzione del tempo degli scaffold dei due polimeri GG-EDA-PEG A e B a $37^\circ C$ in DPBS; (b) Spettri 1H -NMR di GG-EDA-PEG A (sopra) e B (sotto) dopo 7 giorni di degradazione

3.2.5 Prove di stampa

A seguito dello sviluppo e della caratterizzazione dei due *inks*, sono state eseguite delle prove preliminari per studiarne il comportamento durante la fase di estrusione, verificarne l'effettiva stampabilità e la risoluzione dei costrutti ottenuti.

I test sono stati effettuati mediante una stampante Zmorph collegata ad un sistema di controllo della pressione e il modello digitale (Figura 56) è stato prodotto con il software Voxelizer.

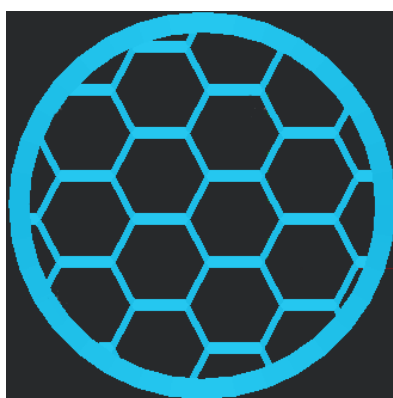


Figura 56. Struttura a nido d'ape, dal diametro di 2 cm, utilizzata come modello digitale per le prove di stampa

È noto che il tipo di materiale impiegato, la pressione esercitata, la velocità di stampa e le dimensioni dell'ugello sono fattori che influenzano notevolmente la risoluzione del costrutto stampato. Di conseguenza, al fine di individuare i valori ottimali di stampa, sono state eseguite diverse prove, variando diversi parametri, quali pressione e velocità di estrusione e utilizzando sempre un ago dal diametro di 27 G (0.413 mm).

Per rendere maggiormente visibile le strutture stampate e studiarne la conformità al modello digitale prodotto, alle dispersioni di entrambi gli *inks* è stato aggiunto blu di timolo (0.1% p/v).

In Figura 57 sono riportati i risultati ottenuti:

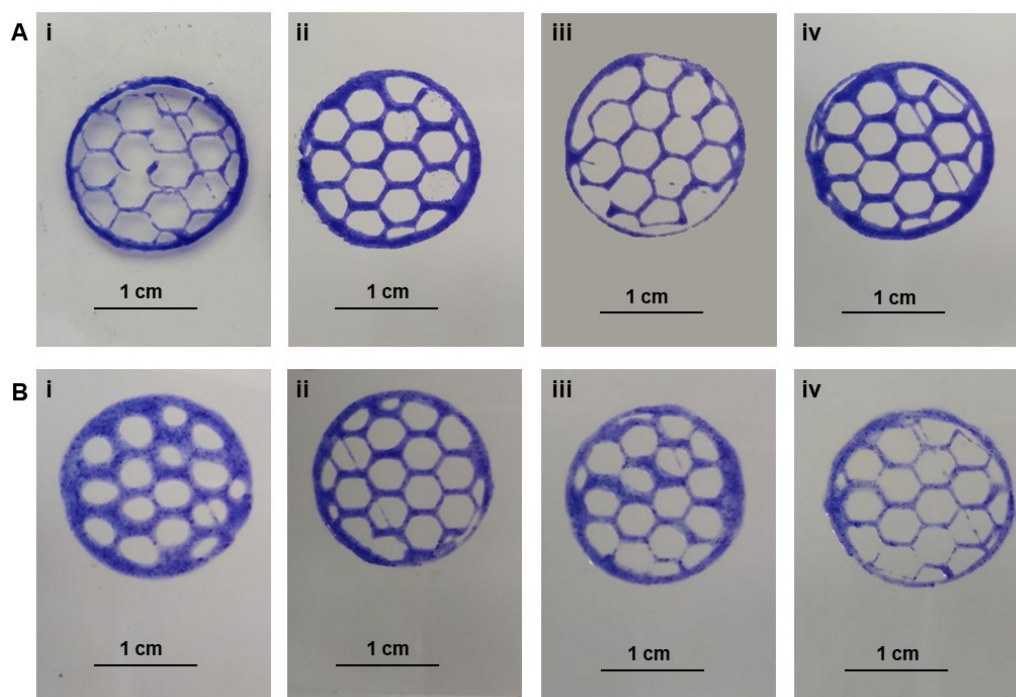


Figura 57. Risultati delle prove di stampa utilizzando (A) l'ink A: (i) 1000 mbar e 20 mm/s; (ii) 1200 mbar e 14 mm/s; (iii) 1000 mbar e 22 mm/s; (iv) 1200 mbar e 16 mm/s; e (B) l'ink B: (i) 400 mbar e 22 mm/s (ii), 500 mbar e 20 mm/s, (iii) 500 mbar e 24 mm/s, (iv) 500 mbar e 25 mm/s

Per l'ink A sono state testate condizioni di pressione e velocità di stampa rispettivamente all'interno del range 1000-1200 mbar e di 14-22 mm/s. La migliore risoluzione è stata ottenuta con una pressione di stampa di 1200 mbar e con la velocità di stampa più bassa tra quelle testate, pari a 14 mm/s.

Per l'ink B sono state testate, invece, condizioni di pressione e velocità di stampa rispettivamente all'interno del range 400-500 mbar e di 20-25 mm/s. La migliore risoluzione è stata ottenuta con una pressione di stampa di 500 mbar e con la velocità pari a 14 mm/s.

Come è possibile osservare, l'ink A, avente G' , G'' e viscosità più elevati di quello B, ha richiesto pressioni maggiori per essere estruso e una velocità di stampa più bassa per ottenere una buona risoluzione. L'ink B, invece, è stato stampato ad una pressione inferiore, ma al contempo ha richiesto una maggiore velocità di stampa per avere una risoluzione paragonabile a quella dell'altro ink.

Inoltre, al fine di valutare la conformità al modello digitale è stata misurata, con il *software* Imagej, l'area delle maglie esagonali presenti nelle strutture stampate aventi migliore risoluzione e confrontata con quelle del modello digitale (Wu, et al., 2018a). Il rapporto percentuale tra le suddette superfici era di circa $85.70\% \pm 4.95\%$ per l'*ink* A e $81.20\% \pm 5.45\%$ per quello B. In aggiunta a questo, è stato misurato lo spessore dei filamenti della struttura ed è stato osservato che, per entrambi gli *inks*, il rapporto tra lo spessore dei filamenti della struttura stampata e il diametro dell'ago utilizzato per la stampa era circa 1.41 ± 0.09 . Tutto questo dimostra che, nelle differenti condizioni utilizzate di pressione e velocità di stampa, entrambi gli *inks* hanno una buona conformità al modello stampato e possono essere impiegati efficacemente in applicazioni di biostampa 3D.

3.2.6 Preparazione e caratterizzazione dei bioinks

La preparazione dei *bioinks* è stata condotta miscelando nei due ink a base di GG-EDA-PEG le dispersioni di due differenti linee cellulari quali cellule di carcinoma del colon umano (HCT-116) e cellule staminali preosteoblastiche murine (MC3T3-E1). Questa scelta è stata fatta considerando che la biostampa 3D, come già sottolineato, è utilizzata sia per la realizzazione di modelli tumorali che per la produzione di *scaffold* per ingegneria tissutale.

La concentrazione dei *bioinks* è stata sempre mantenuta pari al 3% p/v. Inoltre, sono state utilizzate tre diverse densità cellulari pari a $10^7/\text{ml}$, $10^6/\text{ml}$ e $10^4/\text{ml}$ (di seguito indicate rispettivamente come 10M/ml, 1M/ml e 10K/ml), per valutare se e come la densità cellulare influenzi le proprietà dei *bioinks*. Quanto alla caratterizzazione di questi ultimi, sono state effettuate analisi reologiche, studi di *crosslinking* ionotropico e di citocompatibilità *in vitro*.

3.2.7 Caratterizzazione reologica dei bioinks

Le proprietà reologiche dei *bioinks* sono state valutate eseguendo le analisi già condotte sugli *inks* al fine di studiare l'effetto della presenza delle cellule principalmente sui parametri di iniettabilità e recupero, fondamentali per il processo di biostampa.

Le prove di *oscillation amplitude*, hanno dimostrato come, per i *bioinks*, la presenza delle cellule determina, in maniera differente, delle variazioni nell'andamento generale

della curva del modulo G' in funzione della deformazione impressa al sistema (Figura 58a). In particolare, si può notare un effetto maggiore per il *bioink* A rispetto al *bioink* B, che non risente di differenze significative, e l'influenza delle diverse densità cellulari è esaltata in presenza delle cellule MC3T3-E1 rispetto alle cellule HCT-116. Analizzando i valori del modulo G' per il *bioink* A è possibile osservare un aumento di tali valori in presenza delle cellule HCT-116 a tutte le densità testate rispetto al bianco. Tuttavia, è interessante notare che, al contrario di quanto ci si poteva aspettare, non c'è una correlazione diretta tra l'aumento della densità cellulare e l'aumento del modulo G' . Infatti, il *bioink* con la maggiore densità cellulare (10M/ml) determina l'ottenimento di un valore di modulo elastico molto simile a quello del *bioink* con 10K/ml. Probabilmente la presenza di un così alto numero di cellule, se da un lato contribuisce a conferire proprietà strutturanti al sistema, dall'altro può perturbare l'entanglement polimerico diminuendo le interazioni tra le macromolecole di GG-EDA. Questa correlazione tra densità cellulare e G' non è stata riscontrata per il *bioink* B poiché in questo caso la presenza delle cellule sembra causare una lieve e poco significativa diminuzione dei valori di modulo G' . Probabilmente, rispetto al *bioink* A, la presenza delle cellule in una struttura dove l'interazione tra le catene polisaccaridiche è già parzialmente impedita dalla maggiore quantità di PEG-aldeide, determina un ulteriore effetto destrutturante.

Macroscopicamente, la differenza più importante tra le due linee cellulari risiede nella dimensione delle cellule in sospensione. Infatti, le HCT-116 hanno un diametro inferiore rispetto alle cellule MC3T3-E1 quando sottoposte al trattamento con tripsina. Questa differenza di dimensioni potrebbe portare a variazioni significative nel modulo elastico dei due *bioinks*.

Anche per le cellule MC3T3-E1, le prove di *oscillation amplitude*, mostrate in Figura 58c, hanno dimostrato ancora una volta come, per il *bioink* B, l'effetto delle cellule sul modulo G' (*strain* 1%) sia poco significativo. È, invece, interessante notare l'effetto delle differenti densità cellulari sulla variazione di G' nel *bioink* A dove solo la densità di 10K/ml ha determinato una lieve aumento dei valori dello stesso modulo rispetto al bianco mentre valori più alti di densità cellulare ne determinano un decremento.

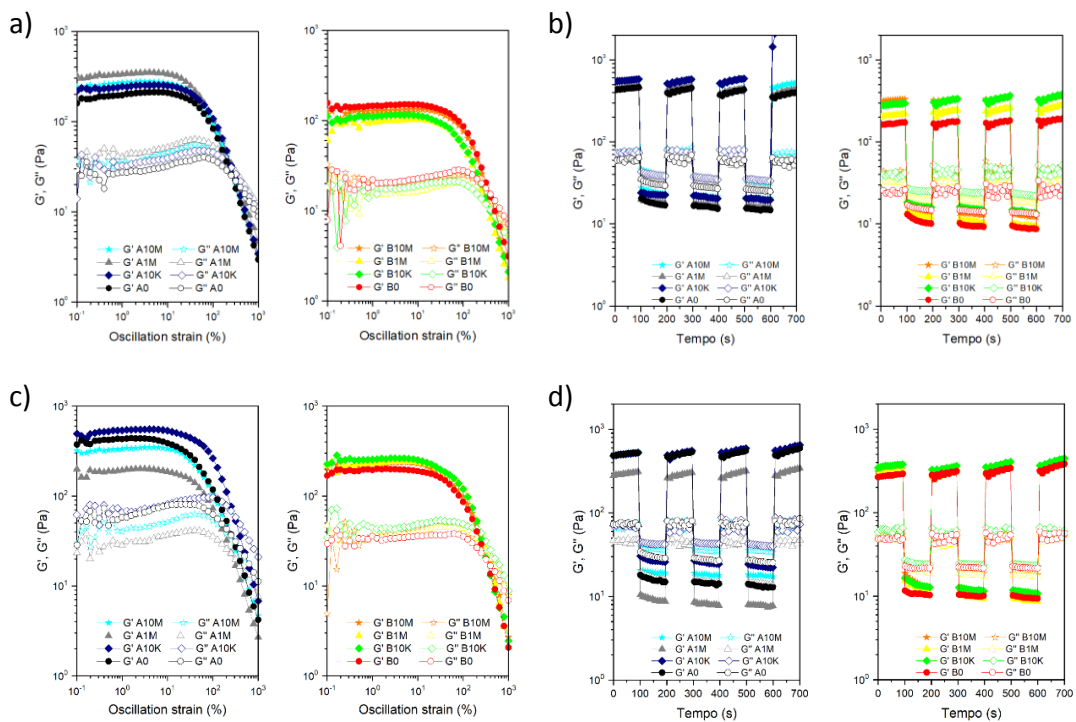


Figura 58. (a) Risultati delle analisi di oscillation amplitude effettuate sui bioinks A (sinistra) e B (destra) al cui interno sono state incapsulate HCT-116 a diverse densità cellulari; (b) risultati delle analisi di recovery time effettuate sui bioinks A (sinistra) e B (destra) al cui interno sono state incapsulate HCT-116 a diverse densità cellulari; (c) risultati delle analisi di oscillation amplitude effettuate sui bioinks A (sinistra) e B (destra) al cui interno sono state incapsulate MC3T3-E1 a diverse densità cellulari; (d) risultati delle analisi di recovery time effettuate sui bioinks A (sinistra) e B (destra) al cui interno sono state incapsulate MC3T3-E1 a diverse densità cellulari

Probabilmente la maggiore dimensione delle cellule MC3T3-E1 ha un effetto destrutturante sull'entanglement polimerico più marcato rispetto alle cellule HCT-116 e questo effetto è maggiormente visibile all'aumentare del numero di cellule nel bioink.

Anche gli studi di recovery time (Figura 58b-d) hanno messo in evidenza come, seppure con variazioni di G' e G'' rispetto al bianco, già evidenziate nelle prove precedenti, nessuna delle densità cellulari abbia influenzato il recupero dei due moduli. Nello specifico, dopo la cessazione dell'applicazione di uno strain del 500%, entrambi i bioinks recuperano circa il 90% del valore iniziale di G' .

3.2.8 Studi di crosslinking ionotropico dei bioinks

Come discusso precedentemente, i bioinks a base di gomma gelano subiscono una reticolazione ionotropica quando a contatto con mezzi che presentano ioni positivi

mono e/o bivalenti. Questo rappresenta un vantaggio poiché, se trattati con soluzioni contenenti tali ioni in seguito al processo di stampa, se ne può rafforzare la struttura. Pertanto, allo scopo di valutare come la presenza di cationi influenzi la strutturazione dei *bioinks* prodotti e le loro proprietà reologiche, sono stati condotti studi di *crosslinking* ionotropico iniettando i suddetti *bioinks* in mezzo cellulare (DMEM) ed eseguendo, dopo 7 giorni, analisi di *frequency sweep* volte a misurare il modulo elastico G' . I risultati delle suddette analisi sono riportati in Figura 59.

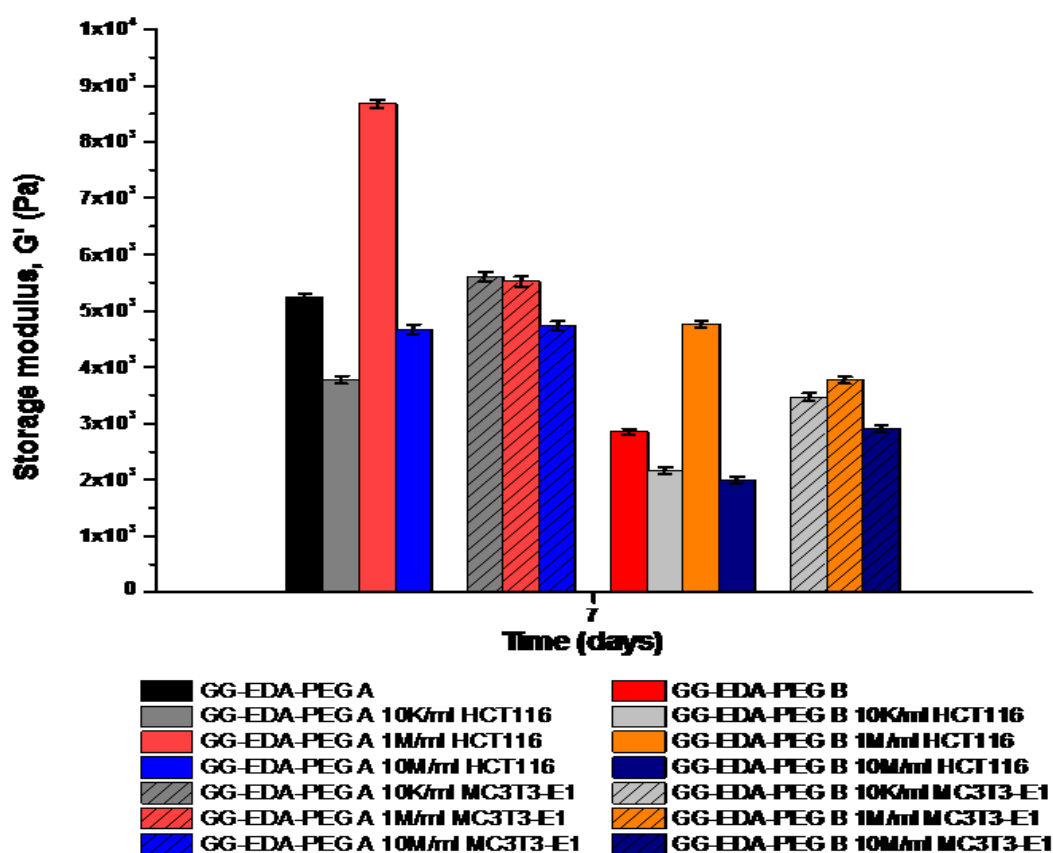


Figura 59. Risultati delle analisi di *frequency sweep* a 7 giorni dei *bioinks* A e B in cui sono state incapsulate HCT-116 e MC3T3-E1 a diverse densità cellulari

In Figura 59 sono stati riportati i valori di G' all'applicazione di uno *strain* pari all'1.0 % con una frequenza angolare di 1 rad/s sui *bioinks* caricati con HCT-116 ed MC3T3-E1. Dal grafico a barre si possono immediatamente notare i più elevati valori di G' per i *bioinks* A rispetto a quelli di B, il che è sempre riconducibile alla diversa quantità di PEG-Aldeide, che fa sì che vi sia un grado di interazione differente (maggiore per A) tra le eliche di gomma gellano, anche in presenza di cationi, tale da determinare una diversa strutturazione dei suddetti *bioinks*.

È bene poi evidenziare l'effetto che le diverse densità cellulari hanno sul valore di G' . Questo valore non aumenta o diminuisce in maniera lineare con la densità cellulare. Quando la densità è pari a 1M/ml si verifica un aumento del modulo elastico per entrambi i polimeri A e B caricati con HCT-116 rispetto al bianco senza cellule, poiché, verosimilmente, questo numero di cellule è tale da favorire una maggiore interazione tra le eliche della gomma gellano. L'introduzione di un tale numero di "particelle" dentro il *bioink* potrebbe strutturarli ulteriormente, aumentando il G' . Viceversa, quando la densità cellulare è inferiore (10K/ml) o superiore (10M/ml), il valore di G' diminuisce.

La densità cellulare di 10M/ml probabilmente, a causa dell'elevato numero di "particelle" micrometriche, è in grado di perturbare l'entanglement polimerico diminuendo le interazioni tra le macromolecole di GG-EDA, mentre a densità di 10K/ml il numero di cellule è troppo basso per conferire proprietà strutturanti al sistema, perturbando lievemente l'interazione tra le eliche di gomma gellano.

L'effetto delle diverse densità cellulari delle MC3T3-E1 sul valore di G' , al contrario, non mostra significative differenze per entrambi i *bioinks*.

3.2.9 Studi di citocompatibilità in vitro dei bionks

Infine, allo scopo di valutare la citocompatibilità, i *bioinks*, preparati come indicato in precedenza, sono stati iniettati in DMEM e analizzati attraverso il saggio MTS dopo 1 e 7 giorni.

In particolare, per entrambe le linee cellulari i risultati ottenuti dopo 1 giorno hanno mostrato, come previsto, una assorbanza decrescente al diminuire delle tre densità cellulari prese in considerazione (10K/ml, 1M/ml, 10M/ml).

Tuttavia, dopo 7 giorni, è possibile notare una riduzione dell'assorbanza e, quindi, della vitalità cellulare per la densità di 10M/ml, mentre nel caso delle altre due densità cellulari, si osserva un progressivo aumento della vitalità delle cellule. Ciò, verosimilmente, è legato alla eccessiva densità cellulare e alla quantità di *bioinks* contenente le cellule, insufficiente per sostenere la crescita continua di queste, ma adeguato a garantire una proliferazione per le densità 1M/ml e 10K/mL.

Inoltre, il saggio MTS ha messo in evidenza una minore assorbanza quando erano incapsulate le MC3T3-E1 rispetto ai valori ottenuti con le HCT-116 (Figura 60). Va, però, sottolineato che, a differenza delle prime, queste ultime hanno un'attività metabolica e una proliferazione notevolmente maggiore, il che potrebbe spiegare la

notevole differenza nei risultati ottenuti. Infine, si può osservare come, a parità di tipo e densità cellulare, le cellule incapsulate nei *bioinks* A mostrano una vitalità leggermente superiore di quelle incapsulate nei *bioinks* B. Questo potrebbe essere dovuto alla diversa strutturazione dell'idrogel, il che si ripercuoterebbe sulla capacità di favorire la vitalità e la crescita cellulare. In ogni caso, i risultati ottenuti permettono di sostenere come il processo di preparazione e miscelazione dei *bioinks* non riduca la vitalità cellulare e che entrambi i polimeri utilizzati siano citocompatibili. Per confermare qualitativamente il saggio MTS, è stato eseguito il saggio *Live&Dead*. I risultati sono mostrati in Figura 60. Come si può osservare, la maggior parte delle cellule hanno mantenuto la loro vitalità e, solo sporadicamente, è stata riscontrata la presenza di cellule non vitali. Si noti, inoltre, la differenza di numero di cellule vive tra le diverse densità cellulari, che conferma l'andamento evidenziato dal saggio MTS, ma che chiaramente è indice della diversa quantità iniziale incapsulata nelle dispersioni dei due polimeri.

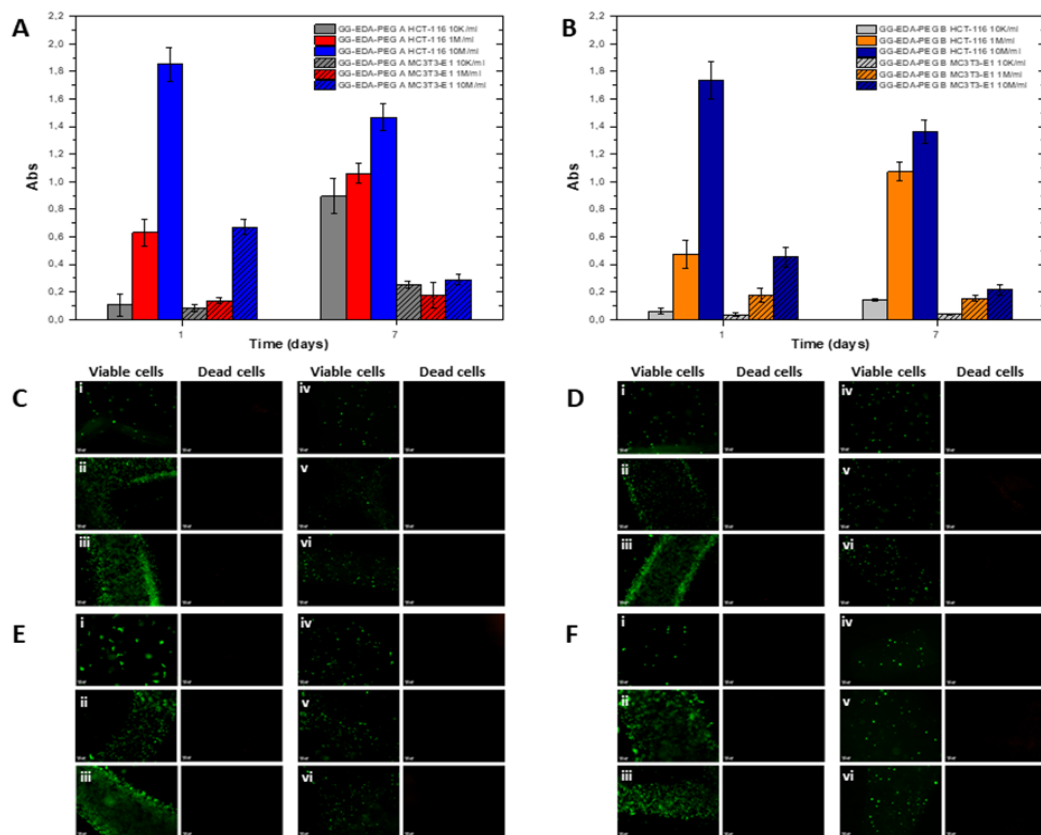


Figure 60. Risultati del saggio MTS dopo 1 e 7 giorni per i bioinks (A) A e (B) B caricati con HCT-116 e MC3T3-E1, alle tre densità cellulari testate. Risultati del saggio Live and Dead dopo 1 e 7 giorni per i bioinks (C-E) A e (D-F) B caricati con HCT-116 alle densità di: 10K/ml (i), 1M/ml (ii), 10M/ml (iii) e MC3T3-E1 alle densità di: 10K/ml (iv), 1M/ml (v), 10M/ml (vi) dopo (C-D) 1 e (E-F) 7 giorni

3.3 Bioink di un derivato dell'acido ialuronico *self-healing* e pH sensibile: sintesi, caratterizzazione e stampabilità

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione di HA-DETA

La degradazione dell'acido ialuronico e la produzione del sale di tetrabuttilammonio (HA-TBA) è stata condotta analogamente alla procedura riportata da Palumbo e coll. (Palumbo, et al., 2006).

Sono state effettuate tre diverse sintesi utilizzando un differente rapporto molare di unità ripetite HA-TBA/4-NPBC, in particolare 0.25, 0.50 e 0.75.

Nello specifico, i tre polimeri sono stati sintetizzati tramite l'attivazione del gruppo ossidrilico della porzione N-acetilglucosamminica dell'HA-TBA con 4-NPBC, seguita dalla sostituzione nucleofila della dietilentriammina (DETA). La purificazione di ciascun prodotto è stata un passo cruciale per evitare che in mezzo acquoso l'eccesso di DETA non legato interagisse elettrostaticamente con i gruppi carbossilici dell'unità glucuronica dell'HA. Per evitare ciò, il prodotto, HA-DETA-TBA è stato precipitato in dietiletere e lavato in acetone, per rimuovere la DETA in eccesso. Successivamente il TBA è stato allontanato in mezzo acquoso tramite dialisi (3.5 kDa) in presenza di NaCl a pH 5.5 e infine in acqua bidistillata.

La sintesi, che porta alla formazione del nuovo derivato HA-DETA, è stata effettuata in DMSOa. In Figura 61 è illustrato il processo sintetico.

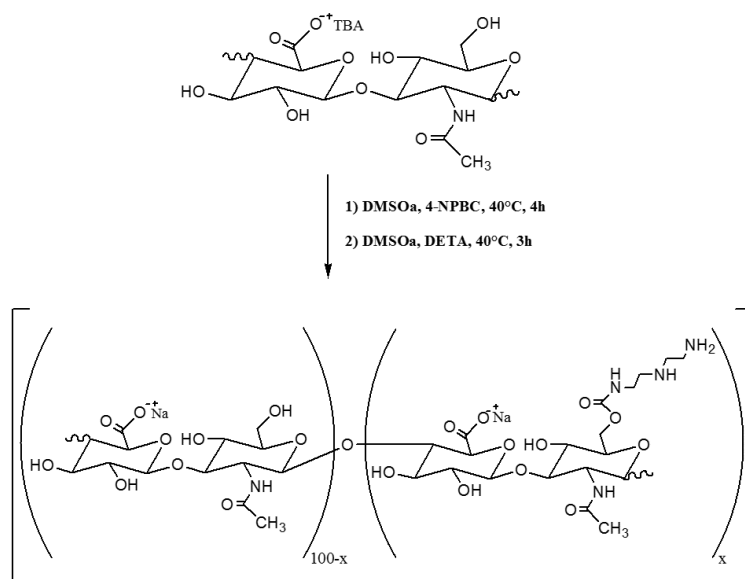


Figura 61. Rappresentazione schematica della sintesi di HA-DETA dove x dipende dal grado di funzionalizzazione

I tre derivati HA-DETA 0.25, 0.50 e 0.75 sono stati caratterizzati per confermare la funzionalizzazione.

Per quantificare il grado di sostituzione in DETA, espresso in mol%, i derivati sono stati caratterizzati con analisi $^1\text{H-NMR}$. In particolare, il grado di derivatizzazione è stato calcolato dal rapporto tra l'area del picco a δ 2.48 attribuibile ai sei protoni ($-\text{CH}_2$) della DETA (β , β') e l'area del picco a δ 1.7 corrispondente a tre protoni ($-\text{CH}_3$) dell'acido ialuronico (α).

Nella Figura 62 è riportato lo spettro del derivato HA-DETA 0.5.

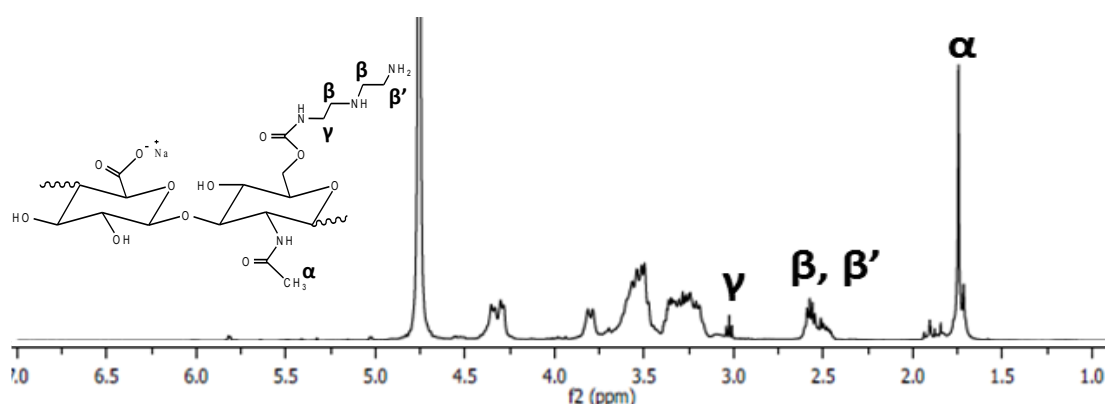


Figura 62. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del polimero HA-DETA 0.5

In particolare, il grado di funzionalizzazione molare è risultato essere pari a $19.5\% \pm 2$, $33\% \pm 3$ e $41\% \pm 4$ per i derivati HA-DETA 0.25, 0.5 e 0.75 rispettivamente. Pertanto, i diversi derivati sono stati identificati come HA-DETA₁₉, HA-DETA₃₃ ed HA-DETA₄₁, riportando per ogni differente derivato HA-DETA un pedice indicante il grado di funzionalizzazione molare. Il saggio colorimetrico TNBS per la determinazione dei gruppi amminici primari ha confermato il dato $^1\text{H-NMR}$ (Craparo, et al. 2020).

Inoltre, al fine di confermare ulteriormente la struttura chimica dei derivati ottenuti è stata effettuata un'analisi di spettroscopia bidimensionale a coerenza quantistica singola eteronucleare (HSQC) e a eteronucleare di correlazione di legame multiplo (HMBC) confrontando il derivato HA-DETA₃₃ con il polimero non funzionalizzato (Figura 63).

Dalla comparazione degli spettri HSQC/HMBC per l'HA non funzionalizzato e l'HA-DETA è possibile confermare che il picco a δ 2.48 (spettro del protone) corrisponde alla porzione dietilenetriaminica che coincide con i picchi a δ 35-50 (spettro del carbonio) attribuibili ai 6 CH_2 attribuiti nello spettro $^1\text{H-NMR}$. Inoltre, dalla

comparazione degli spettri HMBC è possibile notare la comparsa di uno spot di correlazione a δ 175 con il protone a δ 3.5 attribuibile al C=O della funzionalità carbammica (generato attraverso l'aggiunta del 4-NPCB e la successiva funzionalizzazione con DETA), che si aggiunge allo spot a δ 180 (correlato con il CH₂ anomero della porzione glucuronica a δ 4) attribuibile al carbonile del gruppo carbossilico.

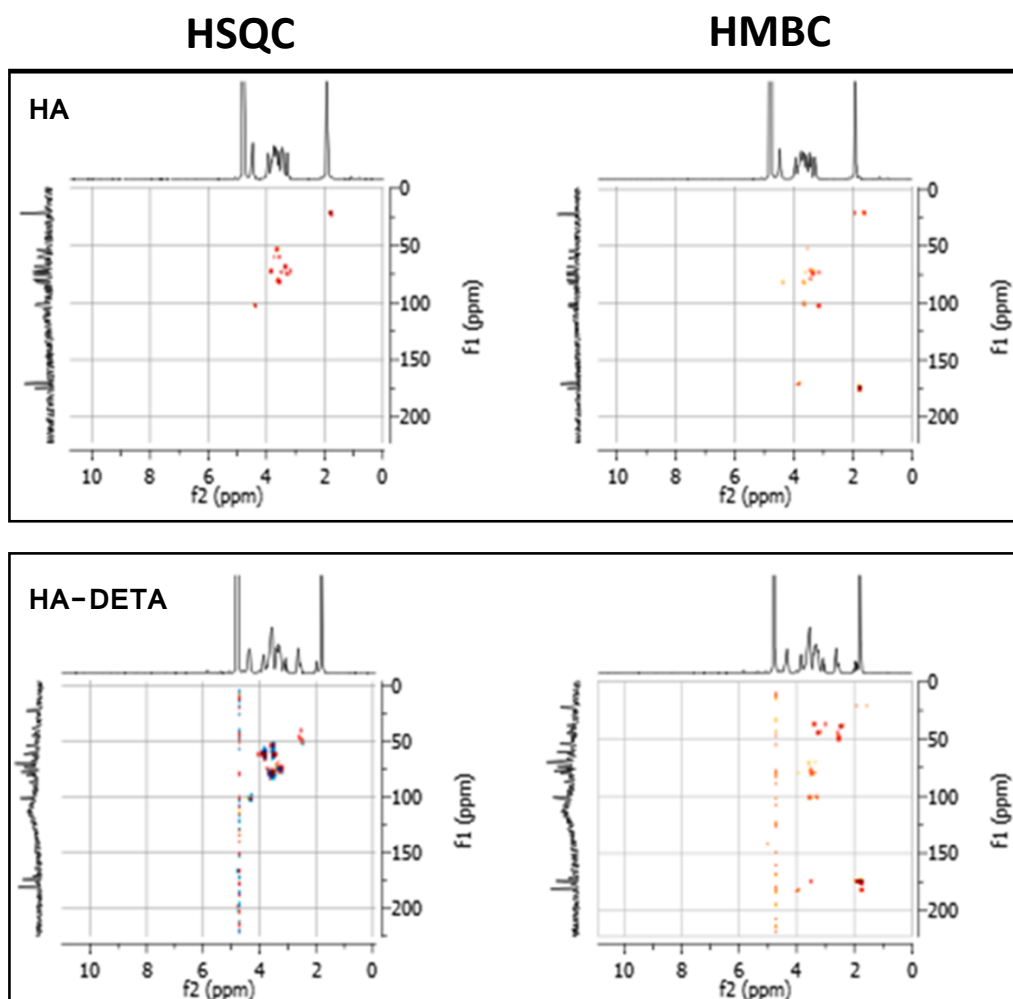


Figura 63. Spettri 2D NMR HSQC e HMBC dell'HA (in alto) e dell'HA-DETA (in basso)

3.3.2 Studi turbidimetrici

Per studiare l'interazione fisica tra i due gruppi amminici della DETA e i gruppi carbossilici dell'HA in mezzo acquoso a vari valori di pH sono state eseguite delle titolazioni turbidimetriche (Figura 64). A seconda del pH del mezzo si sono verificate interazioni elettrostatiche tra i gruppi carichi con valori di trasmittanza (T%) inversamente correlati ad essi, in accordo con la torbidità della dispersione.

Come è possibile dedurre dall'analisi della Figura 64, il pH influenza fortemente le interazioni elettrostatiche e la disperdibilità dei polimeri. In particolare, nel range di pH compreso tra 3 e 5 si riscontra il massimo di torbidità della soluzione a giustificazione di una forte interazione interpolielettrolitica, generata dalla contemporanea presenza di funzionalità COO^- . Vicino alla neutralità, il valore di T% aumenta nuovamente raggiungendo un massimo tra circa 6.8 e 7.8 indicando che il derivato HA-DETA è disperso in maniera ottimale nel mezzo acquoso.

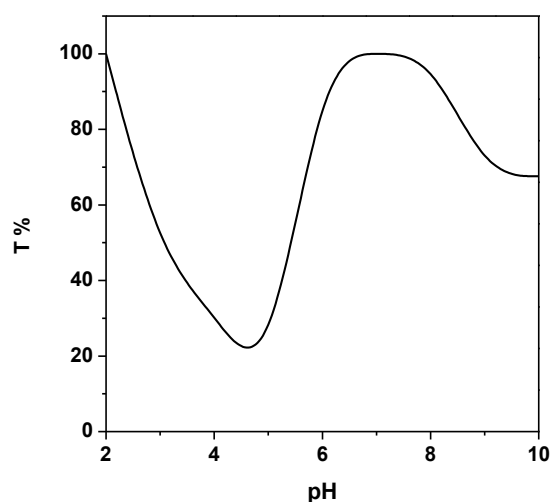


Figura 64. Trasmittanza % di HA-DETA₃₃ al variare del pH

3.3.3 Titolazione potenziometrica

La titolazione potenziometrica dell'HA-DETA₃₃ fornisce informazioni sui valori di pK_a e sulle specie presenti ad ogni pH. Rispetto all'HA, coesistono quattro specie per l'HA-DETA₃₃ e questo influenza fortemente la dipendenza dal pH del polimero confermando l'analisi turbidimetrica precedentemente commentata. In particolare, la curva di titolazione evidenzia la presenza di 3 gruppi rispettivamente con pK_a^1 pari a 3.52, dovuto al gruppo carbossilico della porzione glucuronica dell'HA e pK_a^2 e pK_a^3 , a 5.73 e 9.07 dovuti rispettivamente al gruppo amminico secondario e primario della porzione DETA. La curva di speciazione chimica, che descrive la frazione di specie chimiche presenti ai diversi valori di pH, consente di speculare sul comportamento del polimero HA-DETA₃₃ in mezzo acquoso al variare del pH.

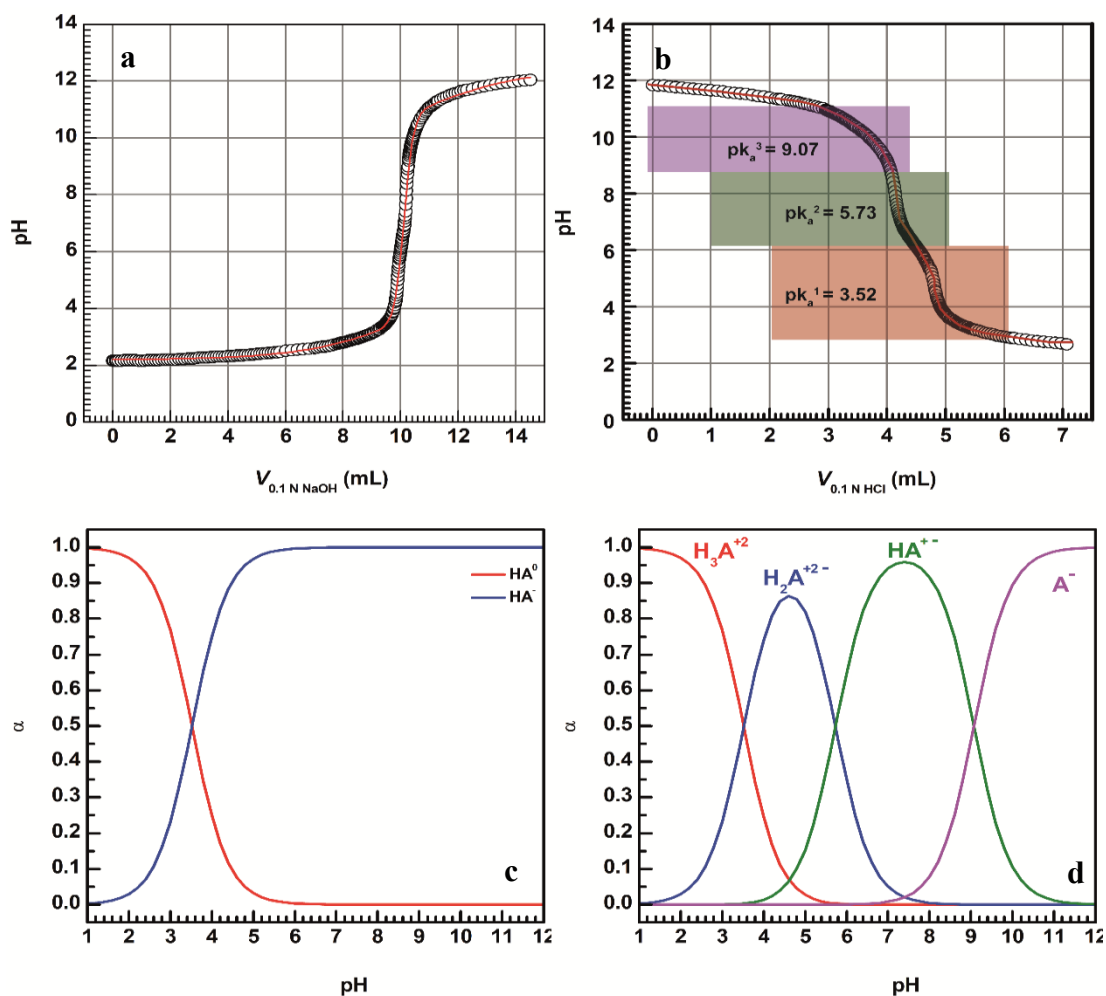


Figura 65. (a) Curva di titolazione e (b) retrotitolazione di HA-DETA₃₃ e curve di speciazione di (c) HA e (d) HA-DETA₃₃

In particolare, dal dato della titolazione turbidimetrica è possibile evidenziare una zona di pH, compresa tra 3 e 5, nella quale il derivato HA-DETA forma delle interazioni che limitano l'affinità verso il mezzo acquoso. Tali interazioni, analizzando il grafico di speciazione chimica, risultano verosimilmente generate dalla contemporanea presenza dei due gruppi amminici della porzione DETA completamente protonati (H_3A^{2+} ed H_2A^{2+}) e una maggiore quantità (crescente al crescere del valore di pH) di gruppi carbossilati (H_2A^{2+}). Invece, nel range di pH compreso tra 5 e 8 si assiste ad un netto miglioramento della disperdibilità del derivato che è verosimilmente dovuto alla maggiore concentrazione della specie che presenta un solo gruppo amminico protonato (HA^{+-}). È noto, infatti, che a pH neutri, la funzionalità DETA, che presenta uno solo dei due gruppi amminici protonati, assume una conformazione ciclica, detta conformazione *gauche*, nella quale il protone residuo è condiviso da entrambe le funzionalità amminiche (Figura 66).

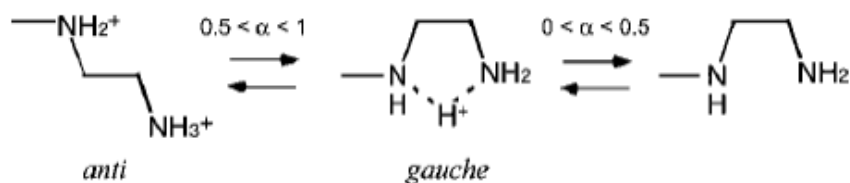


Figura 66. Rappresentazione schematica della conformazione gauche della DETA

In pratica, la porzione 1,2-diamminoetano subisce una protonazione a due step, passando da un pH neutro ad un pH acido pari a 5, accompagnata da una variazione conformazionale da gauche, per la forma monoprottonata a pH 7.4, ad anti, per la forma diprottonata a pH 5 (Miyata, et al., 2008).

In tale conformazione la porzione DETA è meno disponibile per interazioni con le prozioni COO^- e questo limita la formazione di interazioni interpolielettrolitiche che destabilizzano il colloide in dispersione.

Nell'intervallo di pH tra 8 e 10, la T% diminuiva, probabilmente a causa di un incremento della specie (A^-) che potrebbe permettere la formazione di legami idrogeno intracatena aumentando così la viscosità della dispersione. Inoltre, l'aumento dei gruppi $-\text{COO}^-$ potrebbe portare ad un aumento della repulsione con conseguente riorganizzazione delle catene del polimero.

3.3.4 Sintesi e caratterizzazione di HA-aldeide

La sintesi e la caratterizzazione del derivato HA-aldeide (HA-Ald) è stata condotta analogamente alla procedura riportata in letteratura (Su, et al., 2010). In particolare, dopo avere completato la reazione di ossidazione con periodato (Figura 67), l'ossidazione è stata interrotta grazie all'aggiunta di glicole etilenico e il prodotto è stato purificato in dialisi, quindi liofilizzato. La formazione di dialdeidi sull'HA è stata qualitativamente identificata con analisi FT-IR. Il confronto degli spettri FT-IR dell'HA con quello dell'HA-aldeide mostra la formazione di un nuovo picco a 1730 cm^{-1} che è attribuibile allo stretching del $\text{C}=\text{O}$ aldeidico (Figura 68). Tuttavia, il picco è molto piccolo e difficile da differenziare (Banerjee, et al., 2017).

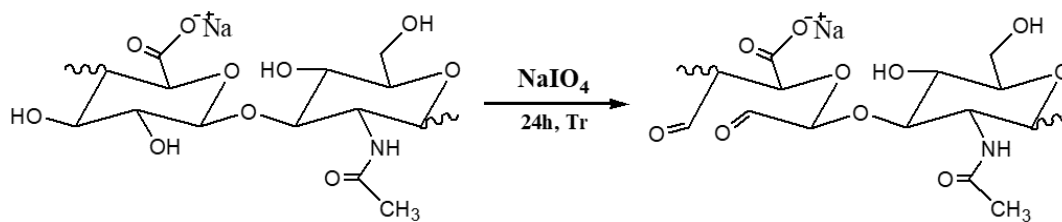


Figura 67. Rappresentazione schematica dell'ossidazione dell'HA

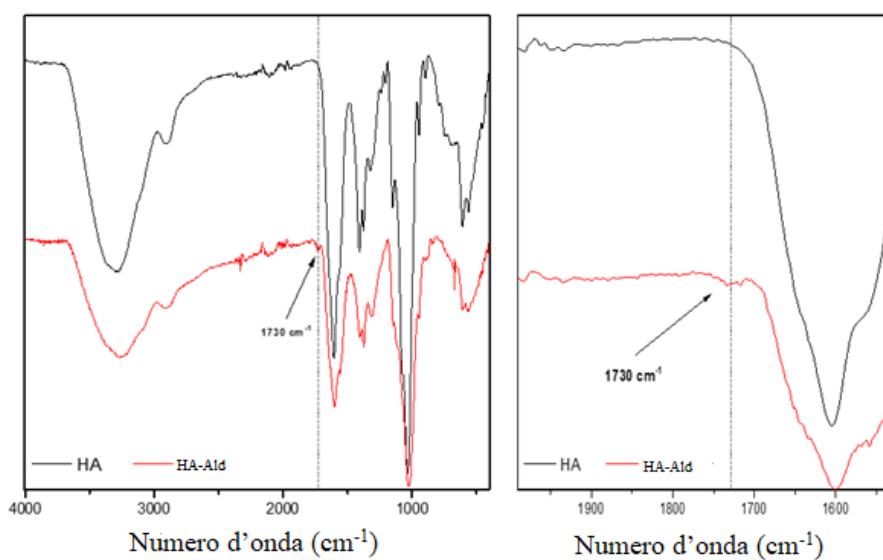


Figura 68. Spettri FT-IR dell'HA-aldeide nell'intervallo 4000-1000 cm^{-1} e 1900-1600 cm^{-1}

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato HA-aldeide è riportato in Figura 69.

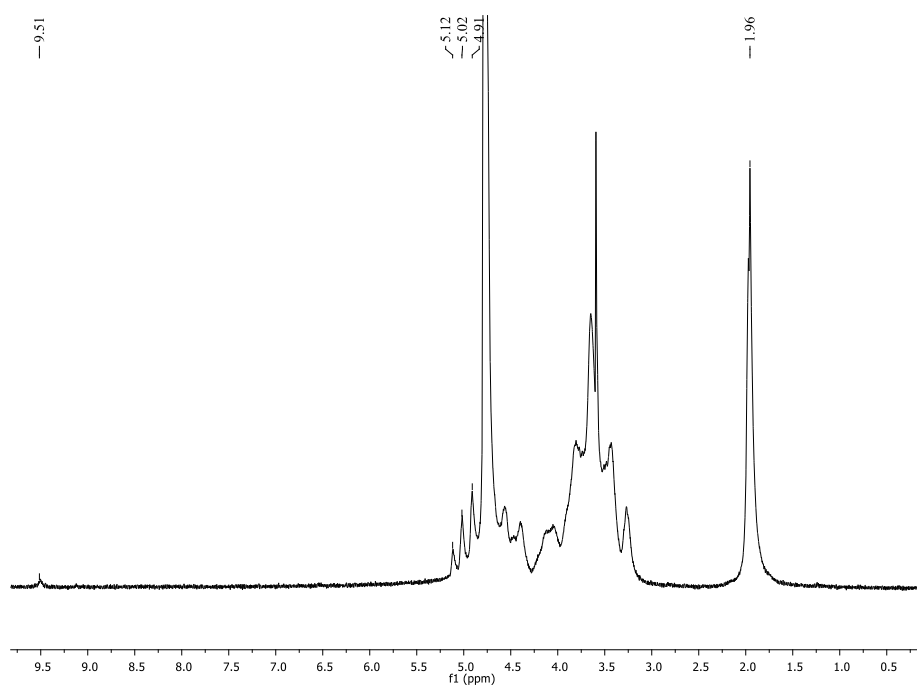


Figura 69. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di HA-aldeide

I picchi a δ 9.51, δ 5.12, δ 5.02 e δ 4.91 dello spettro $^1\text{H-NMR}$ confermano l'avvenuta formazione delle funzionalità aldeidiche (Figura 69). Anche se i picchi relativi alle funzionalità aldeidiche sono evidenti, l'analisi $^1\text{H-NMR}$ non consente di valutare in maniera precisa la reale funzionalizzazione in gruppi aldeidici (Ossipov, et al., 2010). Pertanto, per effettuare la quantificazione, è stato utilizzato un metodo indiretto che si basa sulla funzionalizzazione quantitativa dei gruppi aldeidici tramite il *terz*-butil-carbazato (t-BC) e la successiva quantificazione della funzionalizzazione tramite analisi $^1\text{H-NMR}$.

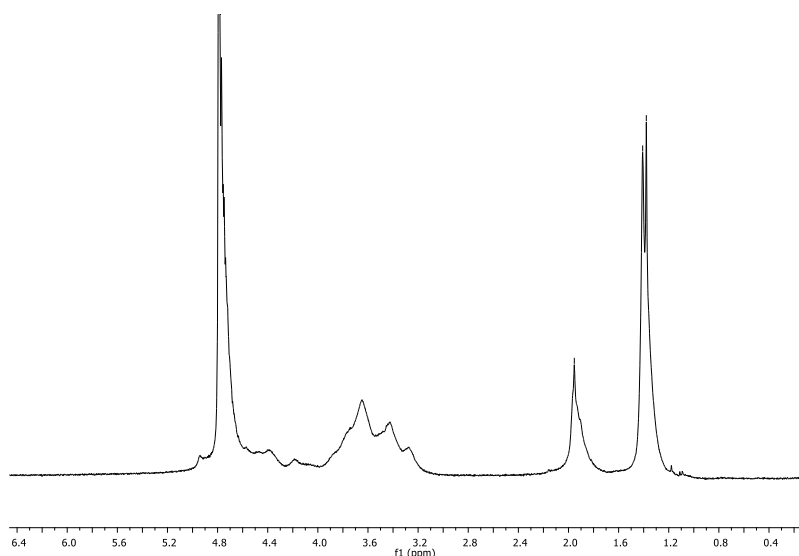


Figura 70. Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'HA-tBC

In particolare, lo spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'HA-t-BC, riportato in Figura 70, mostra i segnali a δ 1.9 e a δ 1.38, attribuibili rispettivamente ai protoni dell'acetammide dell'HA e al sostituito *terz*-butil carbazato. Il rapporto tra questi due segnali mostra una percentuale di gruppi aldeidici del $70\% \pm 5$.

3.3.5 Caratterizzazione SEC

Dai dati riportati in Tabella 5 il PM del derivato HA-DETA₁₉ è paragonabile a quello dell'HA_{LMW} e risulta essere pari a circa 140 kDa. I derivati a maggiore grado di funzionalizzazione HA-DETA₃₃ e HA-DETA₄₁ presentano un peso molecolare eccessivamente grande se paragonato all'HA di partenza. L'elevato PM dei derivati a maggiore funzionalizzazione in DETA è giustificabile se si ipotizza la formazione di

complessi intermolecolari che si possono generare nelle condizioni di eluizione (tampone fosfato pH 6.5/metanolo 9:1) dovuti alla presenza di una parziale carica positiva generata dalla funzionalità dietilentriaminica (DETA) con formazione di aggregati colloidali più grandi. Il PM del derivato HA-aldeide è invece in accordo con i dati riportati in letteratura.

Tabella 5. Valori del peso molecolare medio ponderale (M_w), del peso molecolare medio numerico (M_n) e dell'indice di polidispersità (PDI) dell'HA degradato, dei derivati HA-DETA 19, 33 e 41 e dell'HA-Aldeide

Campione	M_w (Da)	M_n (Da)	PDI
HA degradato	121340	194144	1.6
HA-DETA ₁₉	144259	219273	1.52
HA-DETA ₃₃	493263	804018	1.63
HA-DETA ₄₁	472561	756097	1.60
HA-Aldeide	21530	23683	1.1

3.3.6 Preparazione degli idrogeli e caratterizzazione reologica

Per la preparazione degli idrogeli è stato selezionato il derivato con un contenuto in DETA intermedio, ossia pari a 33 mol % (HA-DETA₃₃). Partendo dalle dispersioni di HA-DETA₃₃ e HA-Ald entrambe al 3% p/v, sono state testate quattro miscele volumetriche HA-Ald /HA-DETA₃₃ pari rispettivamente a 60/40 (3F1), 70/30 (3F2), 75/25 (3F3) e 90/10 (3F4) con concentrazione finale complessiva dei due polimeri pari al 3% p/v. La Figura 71 mostra una rappresentazione schematica della procedura di preparazione degli idrogeli. In particolare, alla dispersione di HA-DETA₃₃ è stato aggiunto sotto agitazione l'HA-Ald con immediata formazione dell'idrogel.



Figura 71. Illustrazione schematica della preparazione degli idrogeli HA-Ald/HA-DETA

Ai differenti rapporti volumetrici di HA-Ald/HA-DETA corrispondono rapporti molari decrescenti tra i gruppi aldeidici (CHO) ed amminici (NH₂) come riportato nella Figura 72a.

E' noto che le proprietà reologiche degli idrogeli giocano un ruolo chiave nel determinare e studiare la macro e la microstruttura, la processabilità e le loro possibili applicazioni.

Per tale motivo, inizialmente sono stati condotti esperimenti di *strain sweep* per valutare la regione di viscoelasticità lineare (LVR). Come è possibile notare dalla Figura 72b, il modulo G' è, a bassi valori di *strain* %, maggiore e parallelo al modulo viscoso G''. Ad alti valori di *strain* % si assiste ad una diminuzione di entrambi i moduli e ad una inversione della loro grandezza. La zona di linearità è delimitata ad alti *strain* % dalla deviazione dalla linearità del modulo elastico, in particolare, all'aumentare del rapporto molare CHO/NH₂, i moduli G' e G'' aumentano mentre l'ampiezza della zona di linearità diminuisce. Valori di modulo elastico maggiori sono indice di una maggiore rigidità dell'idrogel e conseguentemente di valori inferiori di *strain* % critico al quale avviene la rottura del *network* polimerico con il restringimento della LVR. I risultati ottenuti sono in accordo con il grado di reticolazione degli idrogeli dettato dal rapporto molare CHO/NH₂.

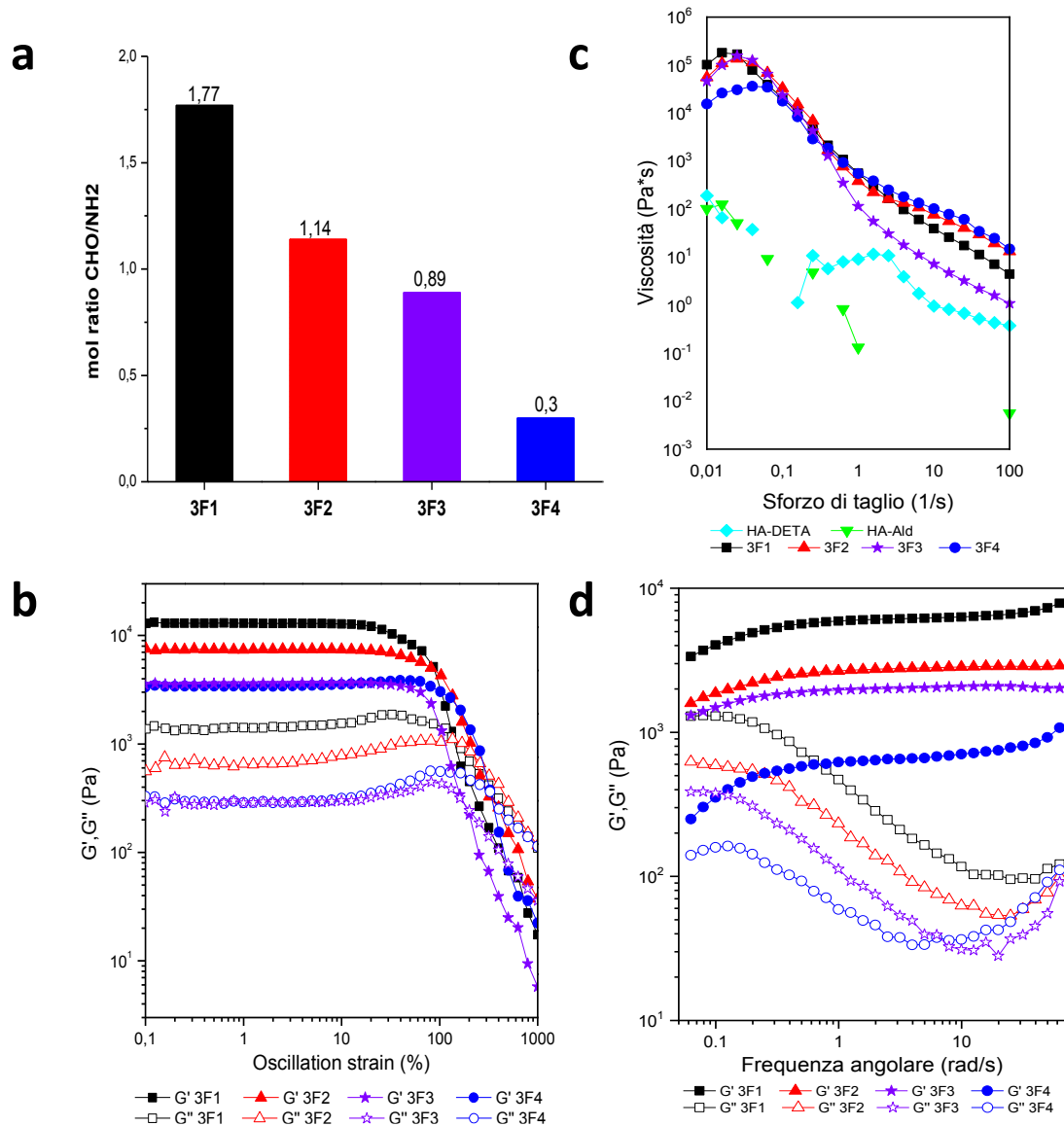


Figura 72. (a) Rappresentazione grafica dei differenti rapporti molari CHO/NH₂ degli idrogeli; analisi di (b) Strain sweep, (c) Flow sweep, (d) Frequency sweep dei campioni 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4

Per studiare il comportamento reologico degli idrogeli, sono state eseguite analisi di *flow sweep*. Nello specifico, l'HA-DETA₃₃, l'HA-Ald e gli idrogeli 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 sono stati sottoposti ad uno *shear rate* crescente da 0.01 fino a 100 s⁻¹. I dati, riportati in Figura 72c, hanno mostrato una diminuzione della viscosità all'aumentare dello *shear rate* per tutti gli idrogeli a diverso rapporto molare.

Per rilevare le variazioni dei moduli G' e G'' in funzione della frequenza angolare sono state effettuate analisi di *frequency sweep*. Come mostrato in Figura 72d, per tutti i campioni, il modulo G' è nettamente superiore al modulo G'' nell'intero range di frequenza analizzato. In particolare, l'andamento del modulo G' mostra un leggero aumento all'aumentare della frequenza applicata (effetto più marcato per l'idrogel

3F4) e risulta essere sempre superiore al modulo viscoso G'' dimostrando che gli idrogeli hanno mantenuto uno stato di *gel*. Inoltre, come si nota dalla Figura 72d, il modulo G' degli idrogeli aumenta con l'aumentare del rapporto molare CHO/NH₂ con valori che sono rispettivamente di circa 5 kPa, 2.5 kPa, 1.5 kPa e 700 Pa per 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 rispettivamente. Questo aumento di G' all'aumentare del rapporto molare CHO/NH₂ deriva dalla formazione di un maggior numero di legami imminici tramite reazione con formazione della base di Schiff, grazie alla presenza di una maggiore quantità di gruppi aldeidici disponibili per la reazione con i gruppi amminici dell'HA-DETA, coerentemente con l'aumentata efficienza di crosslinking (Vedi Tabella 6). Sebbene G' rimanga pressoché invariato, mostrando la formazione di *network* stabili, G'' mostra alcune fluttuazioni in funzione della frequenza. Il modulo viscoso presenta un minimo alla frequenza angolare che diminuisce al diminuire del rapporto molare CHO/NH₂. All'aumentare della frequenza angolare aumenta il rapporto tra G' e G'' portando alla formazione di geli più stabili, comportamento tipico delle base di Schiff, dato dalla presenza di legami dinamici e reversibili capaci di riarrangiarsi continuamente.

3.3.7 Swelling e degradazione

Per valutare ulteriormente l'effetto del *crosslinking* dovuto alla presenza del legame imminico sugli idrogeli, sono stati effettuati degli studi di *swelling*. In particolare, l'analisi è stata eseguita misurando le variazioni in peso dei quattro idrogeli posti in DPBS (pH 7.4) e in tampone fosfato a pH 5.5 a tempi prestabiliti (1 ora, 6 ore, 24 ore, 48 ore, 7 e 14 giorni). I due differenti grafici a barre, Figura 73, mostrano come lo *swelling*, sia in DPBS pH 7.4 che a pH 5.5, aumenta con il diminuire del rapporto molare CHO/NH₂ degli idrogeli per tutti i tempi analizzati. Questo conferma un minor grado di reticolazione degli idrogeli al diminuire dell'HA-Ald aggiunta. Inoltre, confrontando i risultati ottenuti nei due diversi mezzi, si nota che per tutti gli idrogeli si ha un aumento della capacità di *swelling* a pH 5.5, poiché l'ambiente acido incrementa la velocità di protonazione dell'ammina con rottura della base di Schiff generando un idrogel più lasso in grado di trattenere una maggiore quantità di acqua.

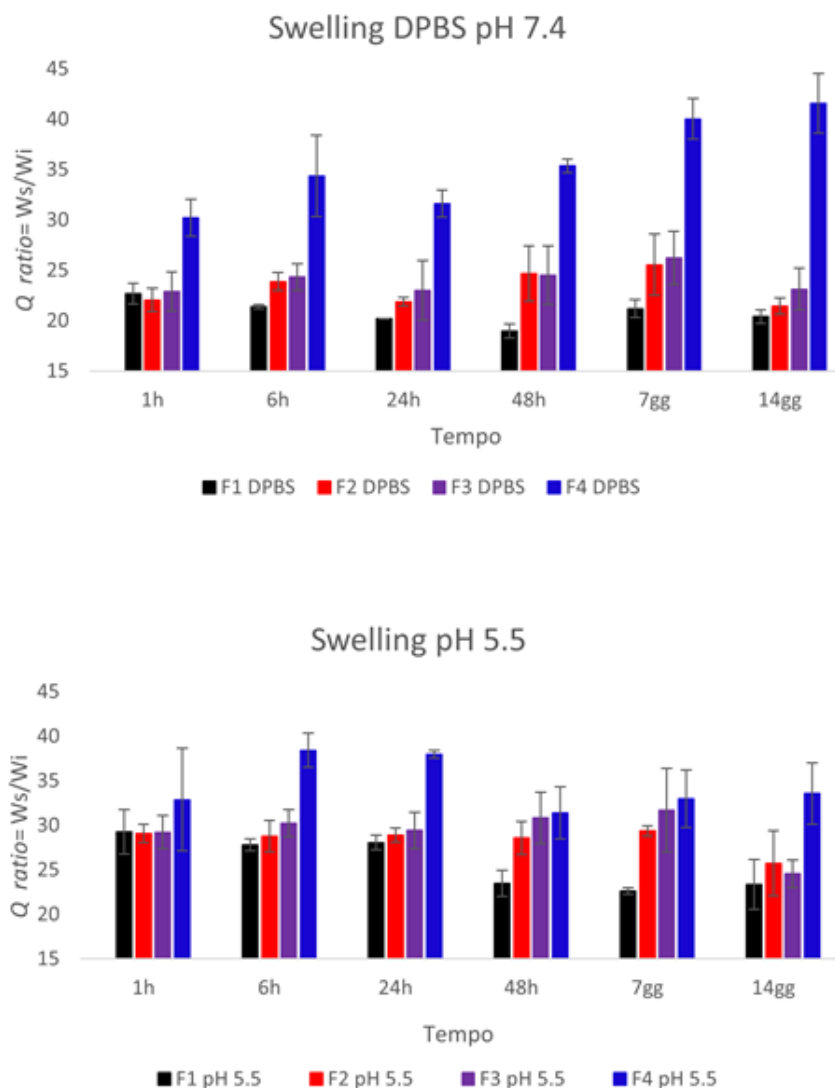


Figura 73. Grafici a barre che rappresentano il grado di swelling degli idrogeli posti in DPBS (in alto) e in tampone fosfato pH 5.5 (in basso) per 1 ora, 6 ore, 24 ore, 48 ore, 7 giorni e 14 giorni

I dati di degradazione ottenuti mostrano come il peso recuperato ai tempi prestabiliti aumenti al diminuire del rapporto molare (Figura 74). Probabilmente nonostante il grado di *crosslinking* maggiore, la presenza di una quantità più elevata di HA-Ald a più basso peso molecolare comporta una perdita in peso maggiore degli idrogeli. Inoltre, si evince che, nonostante la capacità di trattenere l'acqua aumenti al diminuire del rapporto molare e al diminuire del pH, ciò non compromette la degradazione con un peso recuperato finale simile nei due mezzi testati. Si può affermare che, nonostante la capacità di *swelling* negli idrogeli a pH 5.5 risulti maggiore rispetto agli idrogeli posti in DPBS a pH 7.4, questo comportamento non influisce sul grado di degradazione che, infatti, risulta molto simile tra gli idrogeli posti nei due differenti mezzi.

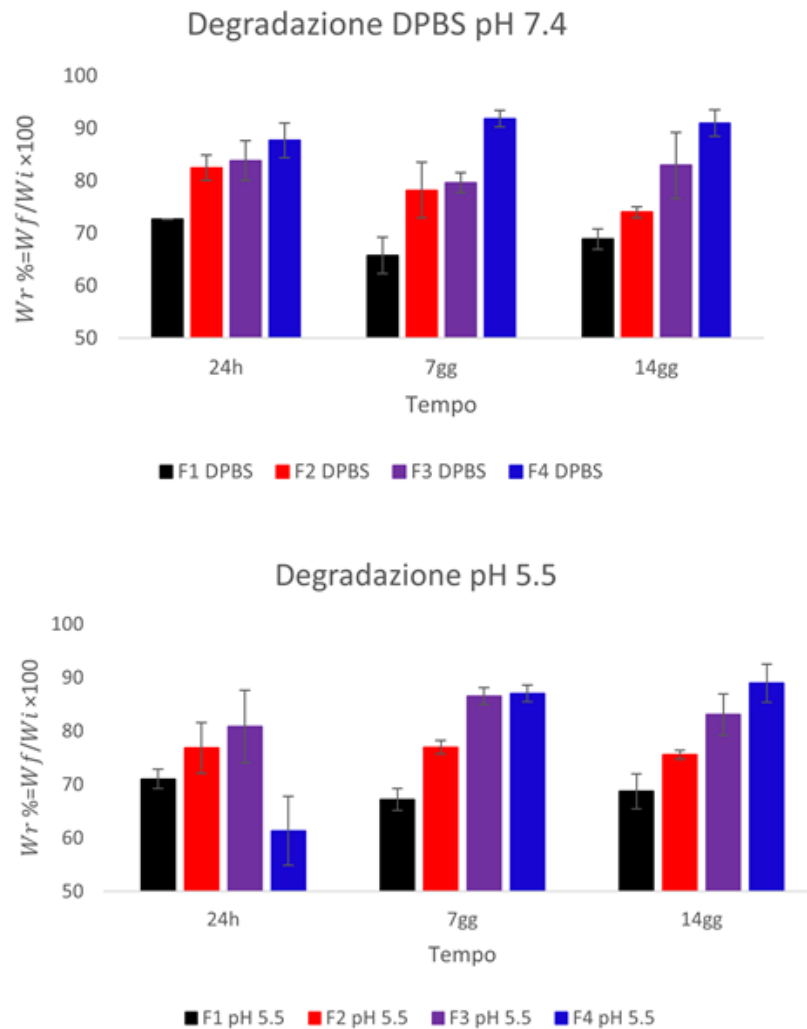


Figura 74. Grafici a barre che rappresentano il peso % recuperato degli idrogeli posti in DPBS pH 7.4 (in alto) e in tampone fosfato pH 5.5 (in basso) per 24 ore, 7 giorni e 14 giorni

Probabilmente questo comportamento può essere spiegato in quanto non solo il legame imminico è pH sensibile ma lo stesso derivato HA-DETA è dipendente dal pH grazie alla presenza del gruppo carbossilico ed amminico primario e secondario. La protonazione, sebbene parziale, di questi gruppi potrebbe dare origine ad interazioni di tipo fisico a valori di pH inferiori a quello fisiologico. Queste interazioni causano una più bassa perdita in peso in HA-Ald che viene trattenuto nonostante venga favorita, in queste condizioni, la rottura del legame imminico.

3.3.8 Tempo di gelificazione

Il tempo di gelificazione è stato studiato per valutare il tempo di formazione dell'idrogel dopo avere miscelato l'HA-DETA₃₃ e l'HA-Ald.

Nel caso di una applicazione dell'idrogel per iniezione locale nel quale si possano sfruttare le proprietà *in situ forming*, se il tempo di gelificazione è troppo lungo, le dispersioni polimeriche possono andare incontro ad un processo di dilavamento una volta iniettate. Se il tempo di gelificazione è troppo breve, l'idrogel si forma troppo velocemente rendendo sfavorevole la miscelazione di eventuali altri agenti farmaceutici per la terapia, e possibilmente, rendendo più difficoltosa l'iniezione del gel. Pertanto, un tempo di gelificazione adeguato è essenziale affinché l'idrogel ottenuto possa essere applicato per iniezione *in situ*.

Dopo aver preparato i quattro idrogeli come descritto sopra, il tempo di gelificazione è stato registrato tramite il metodo dell'inversione del tubo. In particolare, si è osservato che tutti gli idrogeli hanno un tempo di gelificazione inferiore ai 25 secondi e che è stato significativamente influenzato dal contenuto di gruppi aldeidici e gruppi amminici. Con l'aumento del contenuto dei gruppi aldeidici il tempo di gelificazione diminuisce, poiché aumentano i siti reattivi per la formazione della base di Schiff e si ha una resa più efficiente di reticolazione (Figura 75).

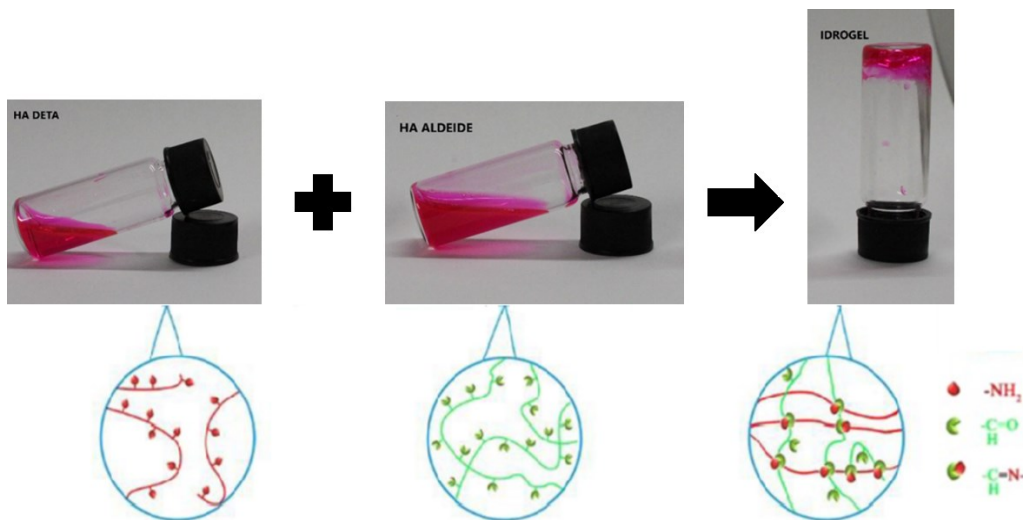


Figura 75. HA-DETA e HA-Ald con rhodamine B (per una migliore visualizzazione della formazione dell'idrogel) prima e dopo la loro miscelazione e rappresentazione schematica della formazione del legame

Il tempo di gelificazione dei geli 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 è risultato essere rispettivamente di 8 ± 3 , 12 ± 5 , 19 ± 2 e 22 ± 4 secondi come riassunto nella Tabella 6 nel paragrafo seguente.

3.3.9 Crosslinking efficiency e caratterizzazione SEM

Il meccanismo di reticolazione avviene attraverso la reazione tra l'HA-DETA₃₃ e l'HA-Ald con formazione del legame imminico. L'efficienza di crosslinking è stata determinata quantificando la riduzione dei gruppi amminici liberi nell'HA-DETA dovuta al loro coinvolgimento nella formazione del legame imminico con l'HA-Ald. Il TNBS utilizzato in questo test reagisce con i gruppi amminici liberi della DETA, formando un complesso trinitrofenile stabile misurato mediante spettrofotometria UV-Visibile (Ragothaman, et al., 2014). Questo test determina il numero di gruppi amminici liberi e il grado di reticolazione nei vari idrogeli a diverso rapporto molare. Dalla Tabella 6 si nota che gli idrogeli 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 hanno mostrato un grado di reticolazione, rispettivamente, del 93%, 88%, 85% e 62% con una diminuzione al diminuire del rapporto molare CHO/NH₂.

Tabella 6. Valori di rapporto molare CHO/NH₂, rapporto volumetrico CHO/NH₂, Efficienza di Reticolazione (E%) e tempo di gelificazione degli idrogeli

Campione	Rapporto Molare CHO/NH ₂	Rapporto volumetrico CHO/NH ₂	Efficienza di Reticolazione (%)	Tempo di gelificazione (s)
3F1	1.77	40/60	93%	8 ± 3
3F2	1.14	30/70	88%	12 ± 5
3F3	0.89	25/75	85%	19 ± 2
3F4	0.3	10/90	62%	22 ± 4

Inoltre, dalle immagini SEM è stata confermata morfologicamente la diversa struttura degli idrogeli in relazione ai valori registrati di *crosslinking efficiency*. In particolare, l'idrogel 3F1, che presenta una maggiore efficienza di reticolazione, risulta meno poroso; man mano che il rapporto molare CHO/NH₂ decresce, si ha una diminuzione del grado di reticolazione con aumento dei pori presenti negli idrogel (Figura 76).

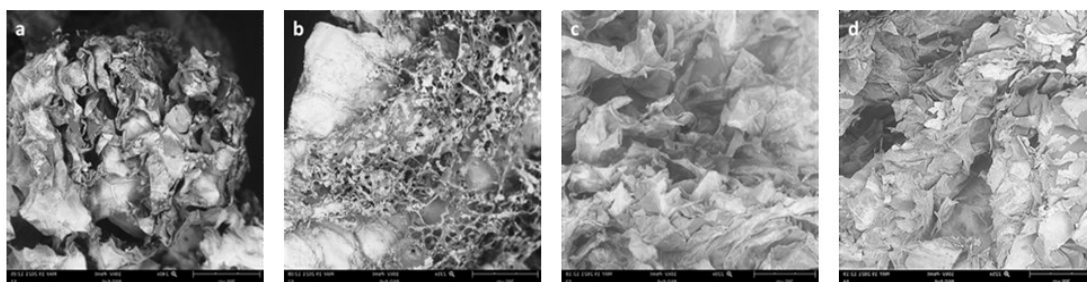


Figura 76. Immagini SEM degli idrogel 3F1 (a), 3F2 (b), 3F3 (c) e 3F4 (d)

3.3.10 Proprietà *self-healing* degli idrogeli

Gli idrogeli iniettabili possiedono un grande potenziale di applicazione nel trattamento delle malattie e nell'ingegneria dei tessuti, ma spesso si verificano danni alla struttura dell'idrogel stesso a causa della forte pressione data dai dispositivi di iniezione o alle forze meccaniche dovute ai movimenti degli arti, nel caso di una applicazione a tale livello. Ciò potrebbe causare ad una rapida degradazione e/o la fuoriuscita dell'idrogel iniettato nella sede di interesse. Gli idrogeli iniettabili *self-healing* possono superare questi inconvenienti tramite la riparazione automatica dei difetti strutturali del gel e il ripristino delle sue funzionalità. Questa caratteristica consente una facile iniettabilità poiché si ha una trasformazione gel-sol-gel reversibile che aumenta la fluidità dei gel per facilitare la loro estrusione dall'ago-siringa e favorisce stabilità dopo la somministrazione (Wu, et al., 2020).

La capacità di *self-healing* è stata visivamente valutata mettendo a contatto due porzioni di gel che sono state colorate diversamente, divise in due parti ed è stata osservata l'interfaccia tra le due porzioni dopo 15 minuti dall'avvenuto contatto (Figura 77) (Li, et al., 2020).

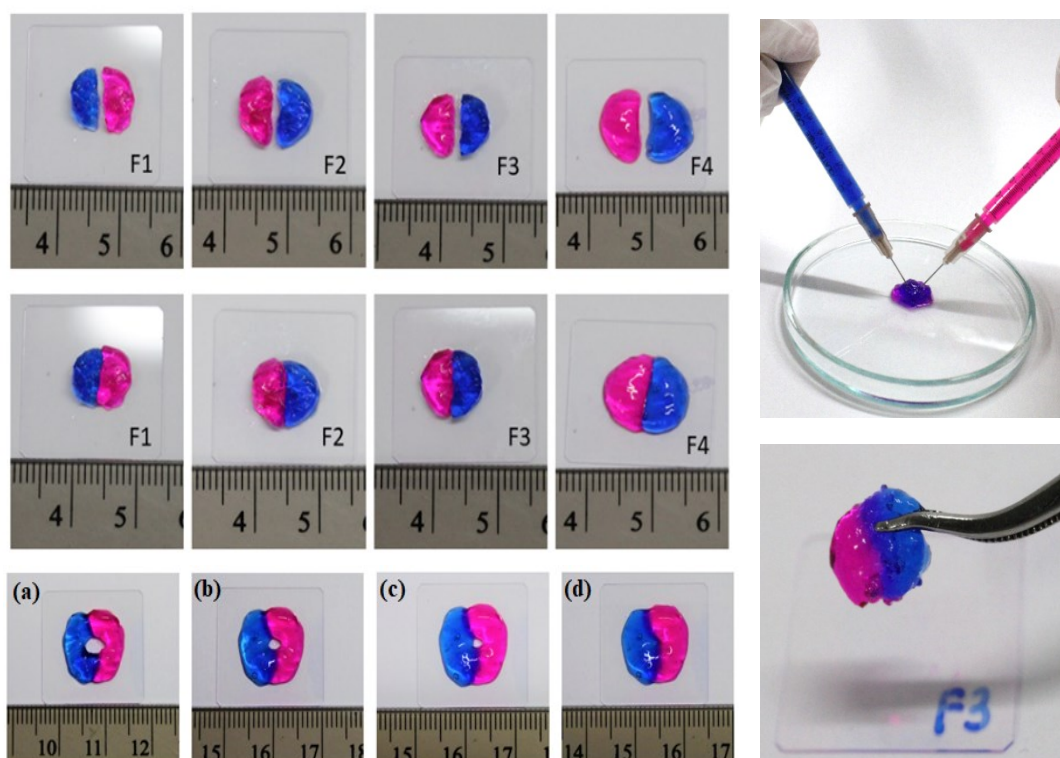


Figura 77. Rappresentazione dei quattro diversi idrogeli aventi differenti concentrazioni CHO/NH₂. L'immagine mostra le proprietà self-healing degli idrogeli precedentemente divisi in due parti. Nell'immagine in basso è stato selezionato l'idrogel 3F4 ed è stato osservato il tempo necessario per l'auto-riparazione

Ad esempio, è stato misurato il tempo, in minuti, necessario affinché si rimarginasse lo spazio lasciato tra due porzioni di gel (Figura 77). In particolare, per l'idrogel 3F4 si è osservato che l'idrogel si è autonomamente "riparato" in 15 minuti. Inoltre, dopo aver frantumato all'interno di un mortaio gli idrogeli in piccoli pezzi è stato misurato il tempo necessario per "l'auto-riparazione" che è avvenuta dopo pochi minuti, come mostrato in Figura 78. Ancora, al microscopio è stato osservato l'idrogel 3F3 dopo averlo diviso in due parti. Dalle immagini si nota la rimarginazione nel tempo, a dimostrazione dell'ottimo comportamento *self-healing* dell'idrogel (Figura 78).

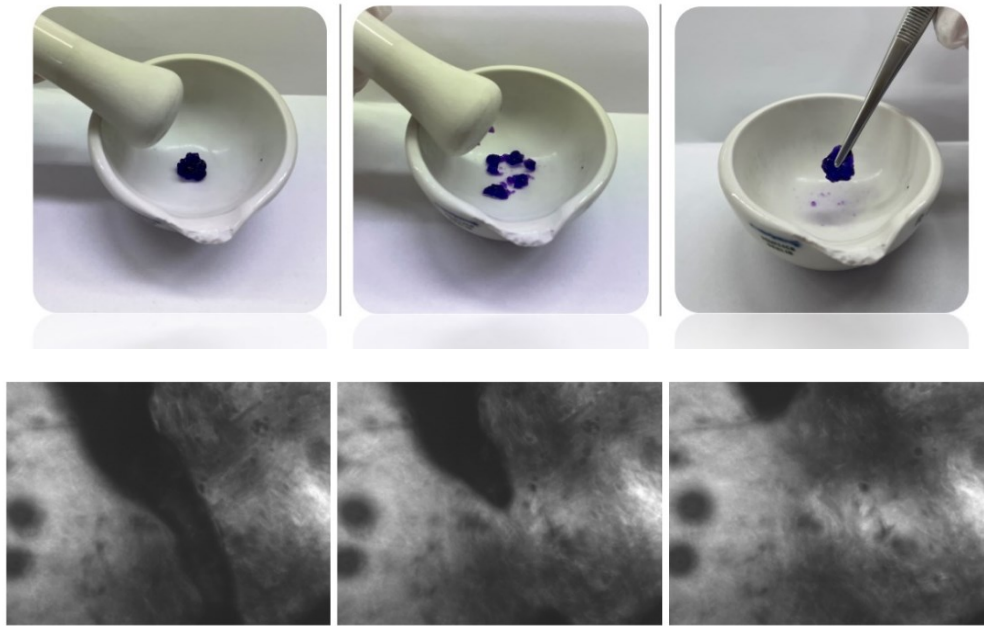


Figura 78. (in alto) Valutazione visiva delle proprietà *self-healing* dopo aver ridotto in piccoli pezzi l'idrogel nel mortaio; (in basso) Time-lapse: Immagini al microscopio dell'idrogel 3F3 a differenti tempi, dopo averlo diviso in due parti

Ciò che conferisce all'idrogel le capacità *self-healing*, senza stimoli esterni, è la presenza di legami dinamici, data la loro continua scissione e autoriparazione. Inoltre vi è anche il contributo dovuto all'instaurarsi di interazioni tra i gruppi COOH dell'acido ialuronico e le porzioni amminiche della DETA introdotta nel backbone polimerico dell'HA (Chen, et al., 2015).

Infine, sono stati eseguiti studi di *recovery time* per monitorare reologicamente il processo di *self-healing*. La Figura 79 mostra i risultati di queste analisi. Per tutti i rapporti CHO/NH₂ saggiati, il valore G' diminuisce bruscamente quando viene applicato un alto *strain* a causa del danneggiamento della rete dell'idrogel.

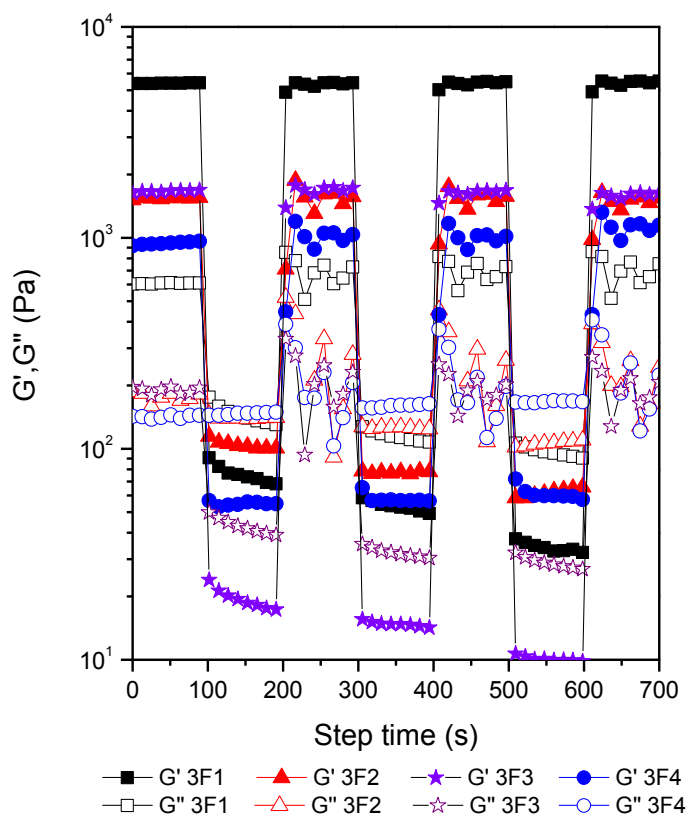


Figura 79. Valutazione del recovery time dei campioni 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4

Tuttavia, il valore di G' è velocemente e completamente recuperato quando la deformazione diminuisce nuovamente, dimostrando un'eccellente capacità *self-healing* degli idrogeli dopo il danneggiamento. In particolare, per tutti gli idrogeli si assiste ad un recupero pressochè immediato e ad un'inversione dei moduli G' e G'' quando viene applicato un alto *strain*. Inoltre, è possibile notare la caduta del modulo elastico durante i cicli di deformazione, molto più evidente per 3F1 e 3F3. I valori di G' di questi ultimi sono più bassi di due ordini di grandezza mentre 3F2 e 3F4 hanno valori di modulo elastico che si riducono, rispetto ai valori a basso *strain* %, di un solo ordine di grandezza quando viene applicato un alto valore di *strain* %.

3.3.11 Studio di pH sensibilità degli idrogeli

Per valutare la pH sensibilità degli idrogeli, sono state effettuate analisi di *frequency sweep*. In particolare, la Figura 80 mostra il modulo elastico (G') dei campioni 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 dopo essere stati immersi in DPBS e tampone fosfato pH 5.5 per 24 ore. In particolare, si nota che il modulo elastico diminuisce e assume valori di un ordine di grandezza inferiore per i campioni in tampone pH 5.5. Quest'analisi

conferma la pH sensibilità del legame dinamico, proprietà, vantaggiosa per il rilascio di farmaci in ingegneria tissutale in presenza di condizioni non fisiologiche.

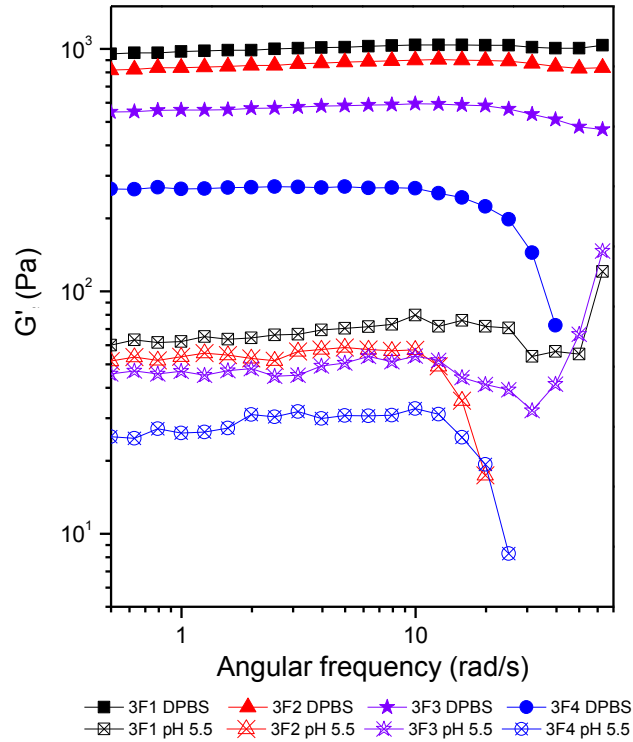


Figura 80. Frequency sweep analisi dei campioni 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 precedentemente immersi in DPBS e tampone fosfato pH 5.5 per 24 ore

È stato selezionato l'idrogel 3F3 per dimostrare visivamente la pH sensibilità di questi idrogeli. In particolare, in Figura 81 si nota che, con l'aggiunta di acido (HCl 1M, 100 μ l), l'idrogel precedentemente formato passa da gel a sol e successivamente, con l'aggiunta di una base (NaOH 1M, 100 μ L) si assiste nuovamente alla trasformazione sol-gel confermando, nuovamente, la sensibilità al pH.

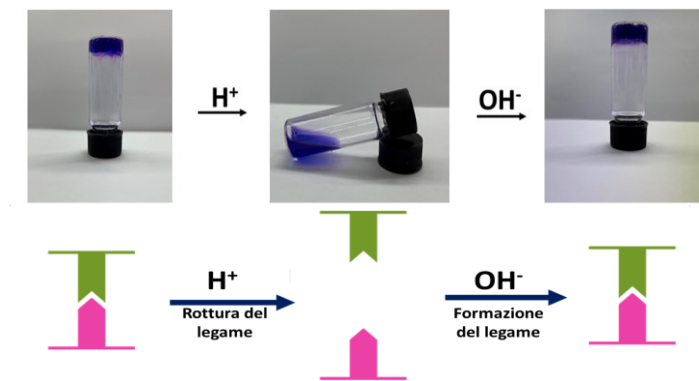


Figura 81. (in alto) Immagine che mostra la pH sensibilità dell'idrogel HA-DETA/HA-Ald dopo avere aggiunto HCl 1M e NaOH 1M; (in basso). Rappresentazione schematica del meccanismo reversibile in funzione del pH

3.3.12 Citocompatibilità/studio della citotossicità

Data la possibilità di impiego degli idrogeli *self-healing* in applicazioni di biostampa, sono stati eseguiti studi di citocompatibilità *in vitro*. In particolare, sono state utilizzate cellule di fibroblasti umani.

Precedentemente, è stata valutata la vitalità dei fibroblasti umani incubati in presenza dei singoli derivati HA-DETA₃₃ e HA-Ald. Tale vitalità è stata espressa come percentuale rispetto ad un controllo costituito da cellule incubate in assenza di campioni. In Figura 82 è possibile notare come il valore di vitalità % in presenza di HA-Ald dimezza dalle 24 alle 48 ore. L'effetto citotossico del derivato HA-Ald è fortemente ridotto quando questo viene reticolato in presenza dell'HA-DETA₃₃ come mostrato dai dati ottenuti dal saggio MTS su fibroblasti presenti negli idrogeli (Figura 82).

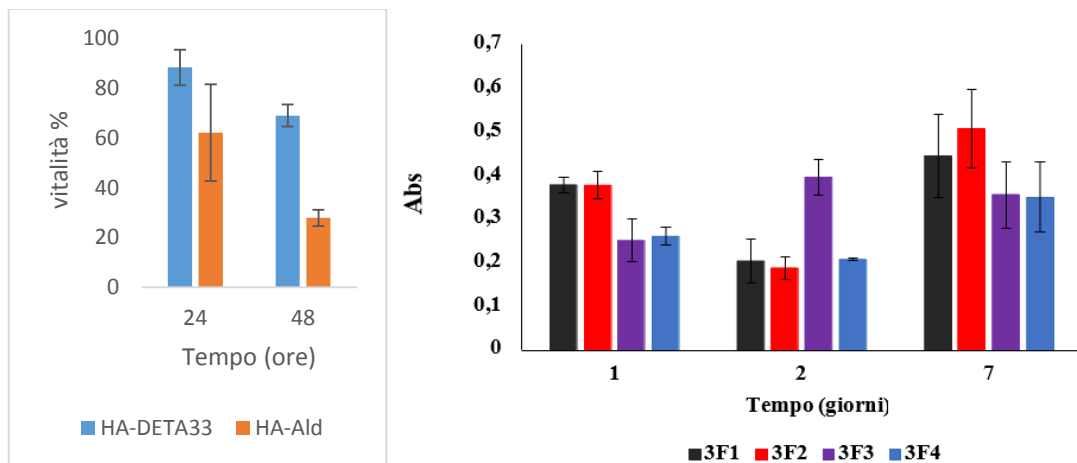


Figura 82. (sinistra) Vitalità dei fibroblasti umani incubati in presenza dei derivati HA-DETA₃₃(blu) e HA-Ald (arancio) (1mg/ml) dopo 24 e 48 ore di incubazione. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al controllo; (destra) Vitalità cellulare dei fibroblasti umani incapsulati negli idrogeli 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 dopo 1, 2 e 7 giorni. I dati sono espressi mediante valori di assorbanza

I dati MTS sono confermati dal saggio *Live and Dead*. Si evince che le cellule incorporate nell'idrogel sono vive indipendentemente dal grado di *crosslinking* presente in funzione del diverso rapporto molare dei campioni testati (Figura 83).

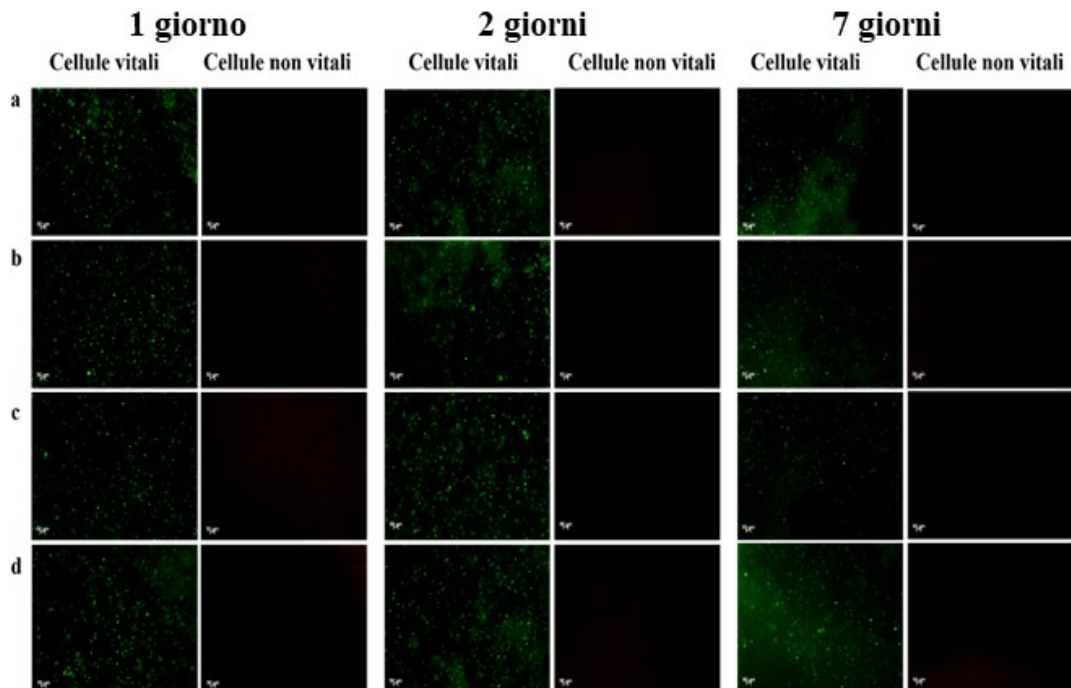


Figura 83. Immagini in fluorescenza dei fibroblasti umani incapsulati negli idrogel 3F1(a), 3F2 (b), 3F3 (c) e 3F4 (d) e incubati per 24 ore, 48 ore e 7 giorni

3.3.13 3D printing

Allo scopo di valutare la possibilità di utilizzare gli idrogeli HA-DETA/HA-Ald per la stampa 3D sono state effettuate delle prove preliminari. Per l'idrogel 3F1 era necessaria una pressione troppo elevata, mentre utilizzando il 3F4 il processo di stampa risultava non efficiente a causa del minore grado di *crosslinking*. Per tali ragioni per le prove di stampa sono stati scelti gli idrogeli 3F2 e 3F3. La Figura 84 mostra una griglia stampata utilizzando l'idrogel 3F3 con stampante BioX della Cellink.

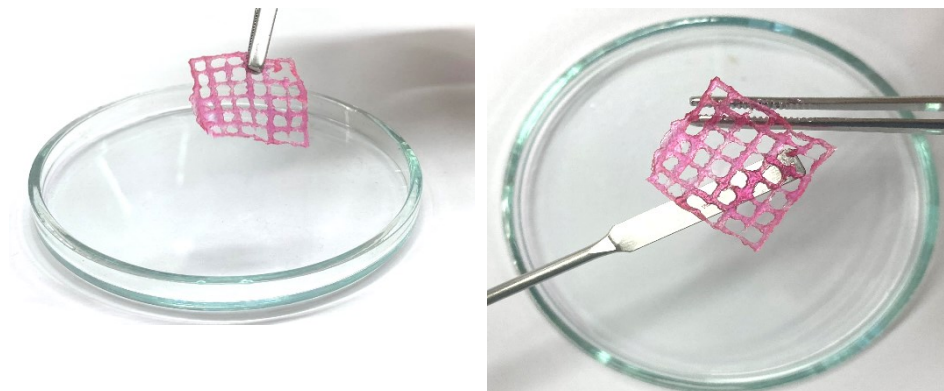


Figura 84. Griglia stampata con l'idrogel 3F3 utilizzando la stampante BioX della Cellink

3.3.14 HA-DETA come stabilizzante per la produzione di nanoparticelle di Ag

Fra i recenti approcci nanotecnologici, lo sviluppo di AgNPs e nanocompositi d'argento trova sempre più applicazione nella creazione di biomateriali con proprietà antibatteriche. Le tecniche di produzione delle nanoparticelle di argento prevedono una fase di riduzione attivata dalla presenza di una molecola riducente (metodi chimici) o di un biopolimero che inneschi il processo di riduzione (metodi green) ed un processo di stabilizzazione che si può ottenere con l'aggiunta di molecole *capping* in grado di coordinare lo ione Ag^+ e favorire un accrescimento controllato della nanoparticella stabilizzando il colloide inorganico. Diversi approcci green prevedono l'utilizzo di biopolimeri quali amido, chitosano ed eparina come agenti riducenti e di *capping* (Sanyasi, et al., 2016).

Per la produzione di biomateriali polimerici contenenti nanoparticelle di argento, la sintesi *in situ* è favorita rispetto alla deposizione diretta (post-trattamento) perché consuma meno tempo, sostanze chimiche ed energia e consente un miglior controllo della deposizione delle NPs nella matrice polimerica con una distribuzione omogenea ed una maggiore riproducibilità.

È ben noto che lo ione Ag^+ ha orbitali ibridi sp, che possono accettare una coppia di elettroni dall'atomo di ossigeno di un gruppo ossidrile o di un atomo di N di un gruppo amminico per formare un legame di coordinazione risultante dalla complessazione di Ag^+ . In letteratura esistono solo pochi esempi di utilizzo di HA nativo come riducente e stabilizzante di nanoparticelle. Abdel-Mohsen e coll. (Abdel-Mohsen, et al., 2013) hanno utilizzato fibre micrometriche di HA, ottenute tramite un processo di elettrospinning come supporto per incorporare AgNPs. In particolare, le fibre di HA sono state disperse con $AgNO_3$ a caldo generando nanoparticelle di 10-20 nm incorporate nelle fibre.

Considerate le capacità *self-healing* e la pH sensibilità degli idrogeli prodotti, sono state sintetizzate nanoparticelle d'argento utilizzando l'HA-DETA₃₃ per la produzione di idrogeli con attività antibatterica tramite successiva reticolazione con l'HA-Ald. La dietilentriammina è stata utile per incrementare la proprietà di *capping* dell'HA al fine di ottenere una più efficiente produzione e stabilizzazione delle AgNPs. In particolare, sono stati utilizzati due differenti metodi di riduzione, il primo prevede la produzione di nanoparticelle di argento utilizzando le capacità riducenti del derivato (*Ag/HA-DETA*) ed un metodo fotochimico che sfrutta l'irraggiamento UV per la generazione delle AgNPs (*Ag/HA-DETA_uv*)

3.3.15 Sintesi e caratterizzazione dei materiali nanocompositi Ag/HA-DETA (senza riduzione UV)

Inizialmente, è stata testata la capacità di riduzione dell'HA-DETA₃₃, utilizzando l'HA come controllo, senza irradiazione UV (Ag/HA-DETA) e monitorando la produzione di AgNPs nel tempo. Un esempio schematico della reazione è riportato nella (Figura 85).

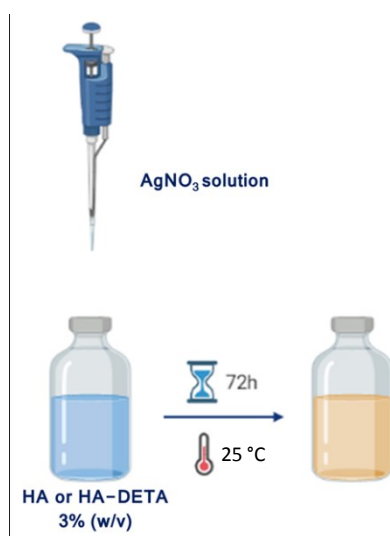


Figura 85. Rappresentazione schematica del metodo di produzione delle AgNPs

E' stato studiato l'effetto del tempo (1, 3, 6, 24, 48 e 72 ore) sulla formazione di nanoparticelle in condizioni costanti (concentrazione di nitrato d'argento 10 mM, con il 3% (p/v) di HA-DETA₃₃ a 25 gradi °C (Figura 86), facendo un paragone diretto con l'HA non funzionalizzato (Mw 121340 KDa).

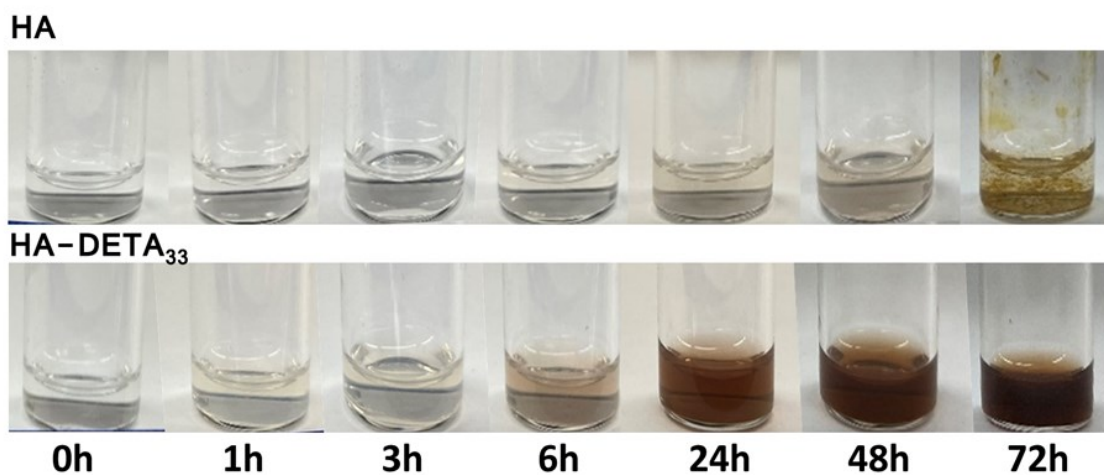


Figura 86. Immagini di dispersioni acquose di nanoparticelle di Ag sintetizzate usando l'HA (in alto) e l'HA-DETA₃₃ (in basso) fino a 72 ore

Le proprietà di Risonanza Plasmonica Superficiale Localizzata (LSPR) conferiscono alle AgNPs un colore marrone scuro a seguito della formazione di nanoparticelle. La Figura 86 mostra le immagini delle dispersioni dopo la sintesi in situ di AgNPs, nel tempo. Come si può notare da questa Figura, i campioni da incolore hanno assunto nel tempo vari gradi di colorazione giallo/marrone per la formazione delle AgNPs. Inoltre, dalla comparazione visiva tra le dispersioni di solo HA e di HA-DETA₃₃, risulta evidente che l'HA, pur stimolando dopo 48 ore la formazione delle nanoparticelle queste ultime risultano non adeguatamente stabilizzate e generano aggregati micrometrici. Invece, in presenza Ag₁₀/HA-DETA₃₃, il colore delle dispersioni cambia progressivamente nel tempo, raggiungendo un incremento di intensità significativo tra 24 e 72 ore. I cambiamenti di colore osservati sono dovuti alla risonanza del plasmone superficiale che dipende strettamente dalle dimensioni, dalla forma e dalla polidispersione delle nanoparticelle.

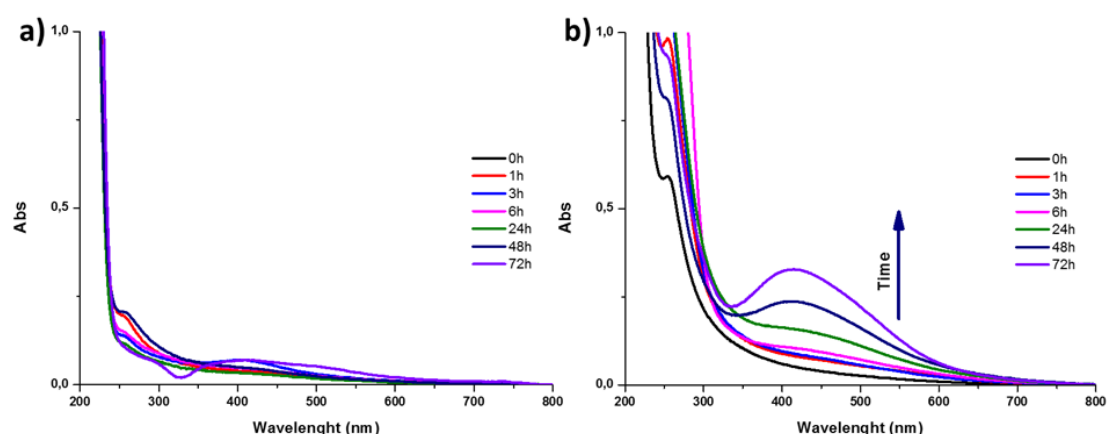


Figura 87. Spettri UV-vis di AgNPs sintetizzate in presenza di (a) HA e (b) HA-DETA₃₃

La spettroscopia UV-visibile è ampiamente utilizzata per studiare le nanoparticelle metalliche. Per comprendere meglio la cinetica della reazione di riduzione, la banda SPR è stata monitorata tramite analisi UV-vis in tempi diversi. La Figura 87a mostra la sovrapposizione degli spettri UV-vis delle AgNPs registrati a tempi diversi (0-72 ore) in presenza di HA (a) e HA-DETA (b). Gli spettri dei campioni in presenza di HA-DETA (Figura 87b) mostrano una banda con un massimo a 412 nm la cui intensità aumenta con l'aumentare del tempo, confermando la progressiva formazione delle nanoparticelle. L'assenza di una banda di risonanza plasmonica di superficie (SPR), che è fortemente influenzata dalla forma, dalle dimensioni e dalla polidispersione delle nanoparticelle, nello spettro al tempo 0 e la trasparenza della soluzione indicano la mancanza di AgNPs.

L'aumento di intensità del picco di risonanza plasmonica di superficie (SPR) dell'Ag10/HA-DETA è verosimilmente dovuto al numero crescente di nanoparticelle formate a seguito della riduzione degli ioni d'argento presenti nella soluzione acquosa. Il massimo della banda di plasmone superficiale nella soluzione di nanoparticelle d'argento rimane vicino a 412 nm per tutto il periodo di reazione, indicando che le particelle sono disperse nella soluzione acquosa senza alcun indizio di aggregazione. Il confronto con l'HA conferma la scarsa capacità riducente e stabilizzante del polisaccaride nativo, almeno a queste condizioni di concentrazione, temperatura e peso molecolare di HA (Figura 87a).

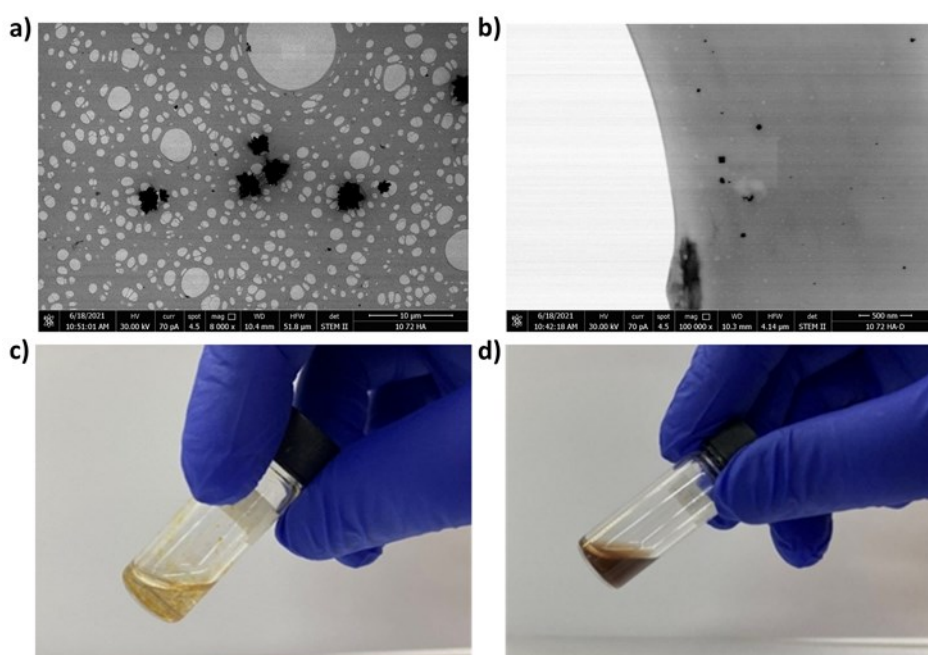


Figura 88. Immagini STEM di nanoparticelle di Ag sintetizzate in presenza di (a) HA e (b) HA-DETA₃₃, (c) Ag10/HA e (d) Ag10/HA-DETA dopo 72 ore

Le immagini STEM (Figura 88) confermano la presenza di nanoparticelle ben disperse con diametro di circa 19-32 nm con forma sferica nel campione Ag10/HA-DETA, e la formazione di aggregati micrometrici nel campione Ag10/HA.

3.3.16 Sintesi e caratterizzazione dei materiali nanocompositi Ag/HA-DETA_{UV} mediante fotoirradiazione UV

La produzione di particelle nanometriche di argento è stata effettuata utilizzando il metodo di irradiazione UV in cui l'HA-DETA è stato utilizzato come stabilizzante. Il

metodo di riduzione UV comporta la radiolisi di soluzioni acquose, che fornisce una via efficace per ridurre gli ioni metallici dei metalli di transizione (Figura 89).

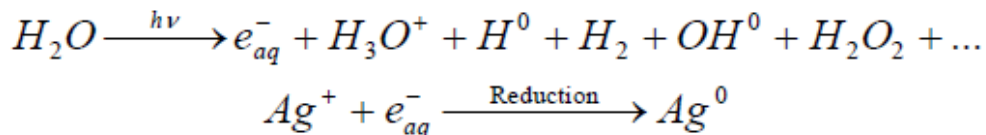


Figura 89. Reazione di radiolisi dell'acqua nella produzione di Ag metallico con irradiazione UV

In particolare, l'irraggiamento UV (365 nm e 100 W) facilita la formazione di elettroni solvatati i quali sono in grado di ridurre i cationi ad atomi metallici, che successivamente fondono per formare agglomerati.

Sono state testate quattro diverse concentrazioni di $AgNO_3$ (1, 5, 10 e 20 mM) e il colore delle dispersioni dopo l'irradiazione UV è cambiato da incolore a giallo, marrone e marrone scuro, con l'aumento della concentrazione di $AgNO_3$ indicando la formazione di AgNPs nelle soluzioni di HA-DETA₃₃ (Figura 90). Il colore giallo/marrone diventa più intenso man mano che aumenta la concentrazione iniziale di nitrato d'argento.

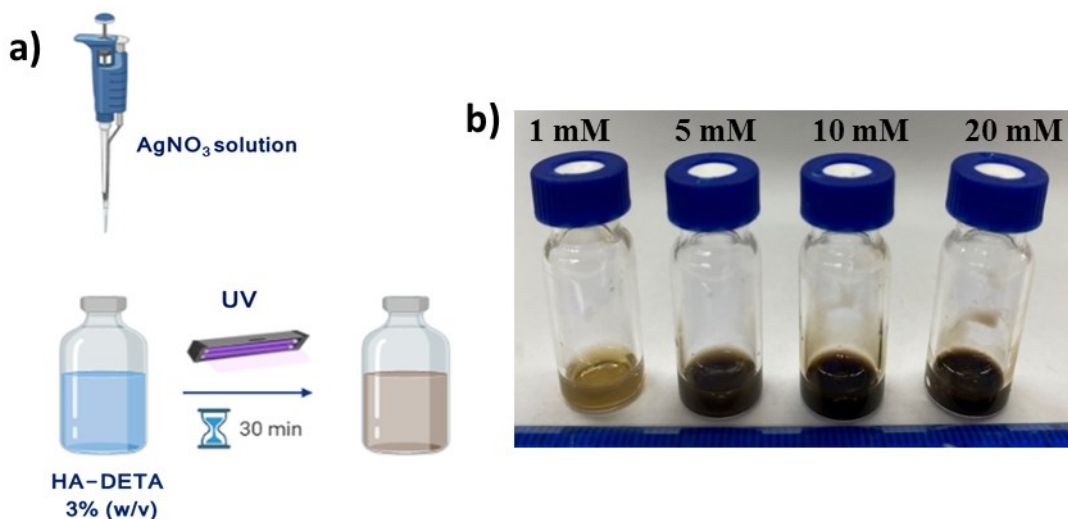


Figura 90. (a) Rappresentazione schematica del metodo di produzione nanoparticelle di Ag tramite irradiazione UV e (b) Ag1/HA-DETA_{uv}, Ag5/HA-DETA_{uv}, Ag10/HA-DETA_{uv} e Ag20/HA-DETA_{uv} dopo 30 minuti di irradiazione

Le nanoparticelle d'argento sono state prodotte con successo dalla riduzione di Ag^+ in un mezzo acquoso e usando l'HA-DETA come stabilizzante e luce UV come riducente, mantenendo fissi tutti gli altri parametri, quali tempo di esposizione, pH e temperatura.

Senza fotoirraggiamento la velocità di nucleazione è più lenta, e questo porta ad una maggiore possibilità che le particelle si aggregino. L'irradiazione UV favorisce una riduzione istantanea e la formazione di più nuclei riducendo la possibilità di ottenere aggregati.

Quando i complessi $\text{Ag}^+/\text{HA-DETA}$ vengono fotoirradiati per 30 minuti, i gruppi ossidrilici e gli atomi di N presenti producono elettroni idratati che agiscono come agenti riducenti per ridurre Ag^+ a Ag^0 . La fotoirradiazione UV del sale di Ag non ha prodotto nanoparticelle di Ag in assenza di gruppi elettrone-donatori. Pertanto, si ritiene che questi gruppi agiscano come agenti riducenti e come *templates* per la crescita di nanoparticelle Ag.

La formazione di AgNPs è stata verificata con la spettroscopia UV-vis. Come si può vedere in Figura 91, l'HA-DETA non ha mostrato alcuno spettro di assorbimento mentre i nanocompositi di Ag mostrano un picco di assorbimento a lunghezza d'onda compresa tra 420 e 450 nm, che è attribuito alla banda di assorbimento del plasmone superficiale delle AgNPs. L'intensità del picco di assorbimento di risonanza del plasmone ottico di AgNPs-HA-DETA aumenta all'aumentare della concentrazione di Ag^+ da 1 a 10 mM. Ciò può essere dovuto all'aumento della quantità di Ag^+ che facilita la complessazione dell' Ag^+ nella matrice; nel frattempo, più ioni di Ag^+ favoriscono la riduzione in Ag^0 . Con l'aumento delle concentrazioni iniziali di nitrato d'argento, i picchi di assorbimento diventano ampi, il che potrebbe essere attribuito ad una maggiore polidispersità delle nanoparticelle. Pertanto, i risultati dell'assorbimento UV-vis hanno confermato la formazione *in situ* di AgNPs all'interno della rete polimerica di HA-DETA.

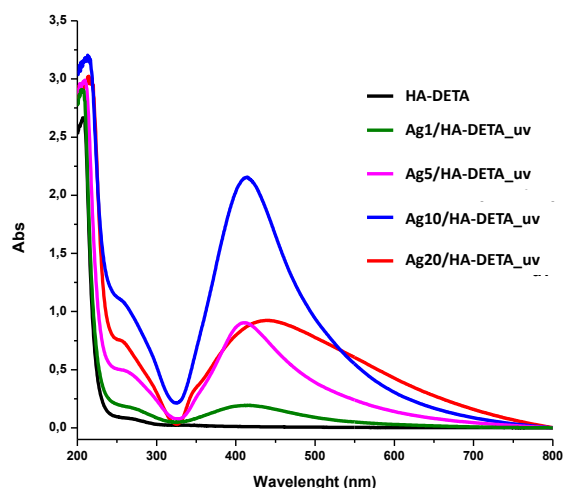


Figura 91. Spettri UV-vis di AgNPs a diverse concentrazioni, sintetizzate tramite fotoirradiazione UV in presenza di HA-DETA₃₃

A causa del loro intenso fenomeno di risonanza del plasmone di superficie gli elettroni nel metallo (elettroni d per l'Ag) sono liberi di viaggiare attraverso il materiale. Quindi, tutte le interazioni si verificano sulla superficie. Quando la lunghezza d'onda della luce è molto più grande della dimensione delle nanoparticelle, essa può predisporre condizioni di risonanza permanenti. La luce in risonanza con l'oscillazione del plasmone superficiale fa oscillare gli elettroni liberi nel metallo. La luce provoca una polarizzazione sulla superficie di elettroni nella particella e si assiste ad una oscillazione in risonanza con la frequenza della luce causando un'oscillazione permanente. Quando la forma o la dimensione della nanoparticella cambia, la geometria della superficie cambia anch'essa causando uno spostamento della densità del campo elettrico sulla superficie. Questo causa un cambiamento nella frequenza di oscillazione degli elettroni, generando diverse sezioni trasversali per le proprietà ottiche, tra cui l'assorbimento e la dispersione. La banda SPR nell'intervallo 400-500 nm fornisce un'indicazione preliminare delle piccole dimensioni (20-60 nm), il che suggerisce anche che le AgNPs hanno una morfologia sferica che è stata ulteriormente confermata dall'analisi STEM (Figura 92). La frequenza e l'ampiezza della banda SPR dipendono dalle dimensioni e dalla forma delle nanoparticelle metalliche. Le transizioni elettroniche che coinvolgono lo ione Ag^+ danno origine a bande di assorbimento situate tra 200 e 230 nm, mentre le transizioni elettroniche di Ag^0 metallico appaiono nella gamma spettrale 250-330 nm. Lo spettro UV-Vis delle AgNPs in questo studio rivela segnali di assorbimento distinti intorno a 250 nm a causa delle transizioni elettroniche che coinvolgono gli ioni Ag^+ .

Un'idea qualitativa per quanto riguarda la forma e la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle può essere ottenuta dalla posizione, larghezza e forma della banda SPR. Ad esempio, una singola banda SPR stretta suggerisce la presenza di particelle monodisperse sferiche, mentre la banda larga indica l'ampia distribuzione delle dimensioni delle particelle. Con l'aumento della concentrazione di AgNO_3 le bande SPR sono più larghe dei campioni con meno AgNO_3 . Inoltre, l'assorbimento è stato registrato a lunghezze d'onda maggiori rispetto ai campioni con meno AgNO_3 .

I grafici di assorbimento dei campioni Ag1/HA-DETA_uv, Ag5/HA-Deta_uv e Ag10/HA-Deta_uv hanno mostrato una banda larga a 412 nm, mentre Ag20/HA-Deta_uv ha mostrato una banda larga (rossa) a 434 nm con una spalla a 342 nm e un valore di assorbanza minore, che indica un'ampia distribuzione granulometrica (Figura

91). Questo è di solito correlato alla formazione di grandi nanoparticelle sferiche e non sferiche con conseguente allargamento e red-shift della banda SPR (Mulvaney, 1996). Una dispersione colorata più scura è stata ottenuta quando le concentrazioni di nitrato d'argento sono aumentate e questo può essere dovuto ad una maggiore formazione di AgNPs come confermato dal red-shift sugli spettri UV-vis e dall'analisi STEM. Una più alta concentrazione di AgNO₃ forma nuclei che vengono stabilizzati dai polimeri mentre la quantità in eccesso non è stabilizzata e supporta la crescita delle nanoparticelle.

3.3.17 Analisi di microscopia a scansione e trasmissione elettronica (STEM)

La Figura 92 mostra le immagini STEM dei campioni Ag1/HA-DETA_uv/ Ag5/HA-DETA_uv Ag10/HA-DETA_uv e Ag20/HA-DETA_uv. Tutte le immagini mostrano le nanoparticelle di Ag sferiche all'interno della matrice polimerica. Le nanoparticelle sono ben separate l'una dall'altra in tutti i campioni analizzati ad eccezione del campione Ag20/HA-DETA_uv che mostra alcune regioni di nanoparticelle aggregate. Questi risultati sono in accordo con i dati ottenuti dagli spettri di assorbimento UV-vis.

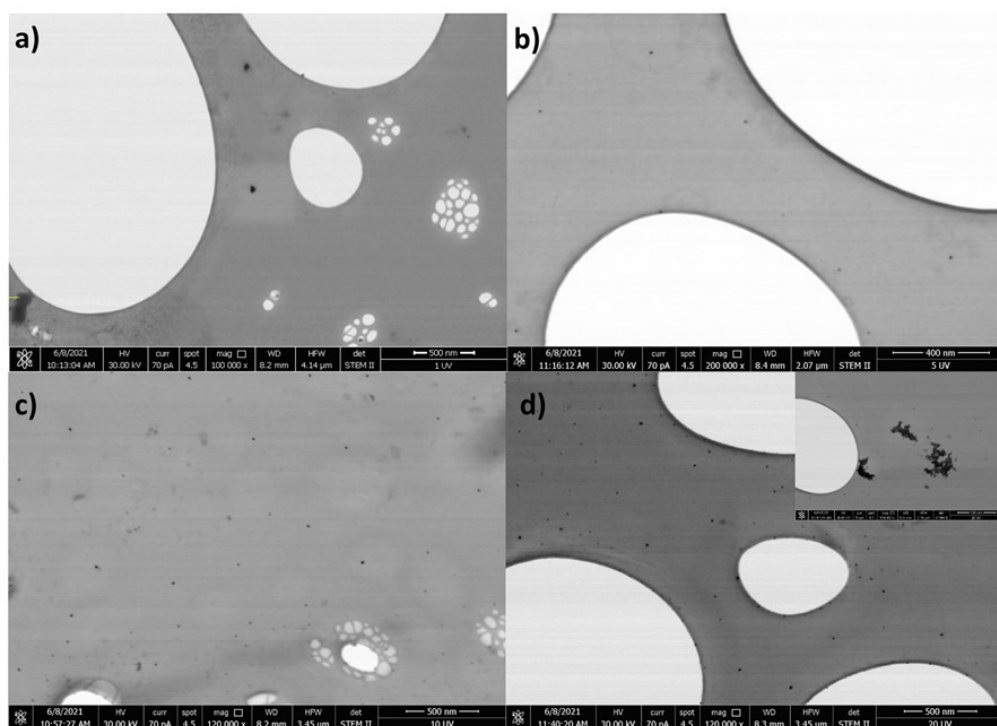


Figura 92. Immagini STEM di nanoparticelle di Ag a diverse concentrazioni, sintetizzate in presenza di e HA-DETA33; Ag1/HA-DETA_uv (a), Ag5/HA-DETA_uv (b), Ag10/HA-DETA_uv (c), Ag20/HA-DETA_uv (d)

3.3.18 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)

L'analisi XPS è stata effettuata per confermare la produzione di AgNPs.

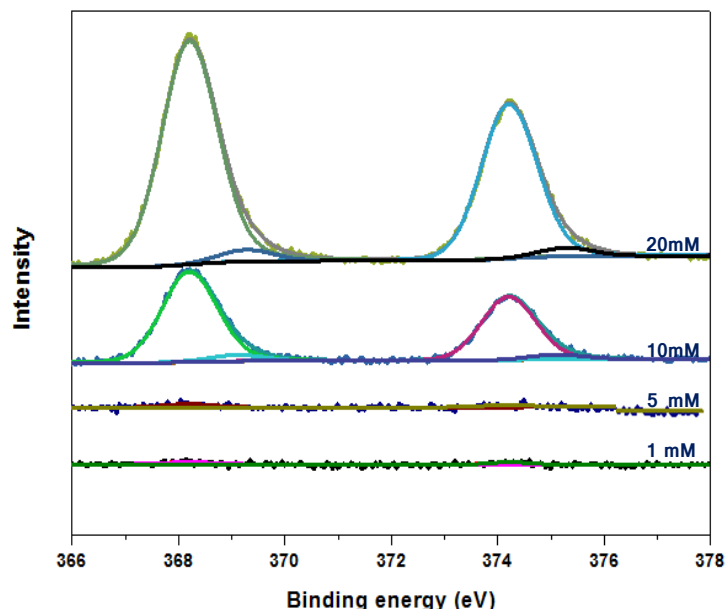


Figura 93. Spettri XPS di Ag1/HA-DETA_uv, Ag5/HA-DETA_uv, Ag10/HA-DETA_uv, Ag20/HA-DETA_uv

La Figura 93 mostra gli spettri XPS dei campioni Ag1/HA-DETA_uv/ Ag5/HA-DETA_uv Ag10/HA-DETA_uv e Ag20/HA-DETA_uv. Gli spettri hanno mostrato picchi di energia di legame rispettivamente a 368.2 e 374.2 eV per Ag 3d 5/2 e Ag 3d 3/2.

In particolare, per i campioni Ag1/HA-DETA_uv e Ag5/HA-DETA_uv, che sono risultati molto diluiti, è stato possibile apprezzare la presenza di un doppietto caratteristico della presenza di Ag metallico (Ag 3d: 368.2 eV, 374.2 eV), anche se il basso rapporto segnale/rumore ha impedito di apprezzare ulteriori dettagli. Gli spettri dei campioni Ag10/HA-DETA_uv e Ag20/HA-DETA_uv hanno evidenziato, invece, la presenza di due specie di Ag; la prima, presente in quantità maggiore, è attribuibile ad Ag metallico (Ag 3d: 368.2 eV, 374.2 eV); la seconda, ad Ag 3d: 369.1 eV, 375.1 eV per il campione Ag10/HA-DETA_uv e 369.3 eV, 375.3 eV per il campione Ag20/HA-DETA_uv, attribuibile a Ag⁺. La specie Ag⁺ ha un'abbondanza relativa del 6.68 % e del 4.91 % per i campioni Ag10/HA-DETA_uv e Ag20/HA-DETA_uv, rispettivamente.

3.3.19 Studi di citocompatibilità *in vitro*

È stato spesso riportato che le AgNPs mostrano un effetto citotossico in un modo dose-dipendente e una ridotta vitalità cellulare. Allo scopo di valutare se la stabilizzazione ottenuta con HA-DETA sia in grado di limitare eventuali effetti tossici è stato effettuato un test *in vitro* di citocompatibilità su MC3T3-E1 (cellule preosteoblastiche murine).

La vitalità è stata valutata tramite saggio colorimetrico MTS ed espressa in percentuale rispetto ad un controllo costituito da cellule incubate in assenza di campioni. Nella Figura 94 è possibile notare come i valori di tutti i campioni sono superiori all'80% dopo 24 e superiori alla vitalità delle cellule controllo dopo 48 ore. Questo risultato può essere spiegato dalla capacità dell'HA-DETA di stabilizzare le nanoparticelle e di controllare il rilascio dell'Ag⁺. Inoltre, l'incorporazione delle AgNPs nell'idrogel può rallentare il rilascio e portare ad una diminuzione della citotossicità.

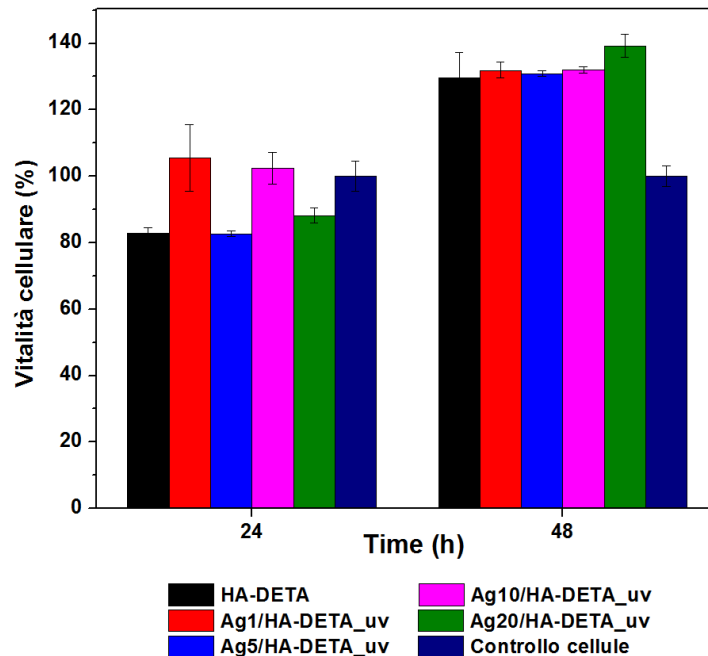
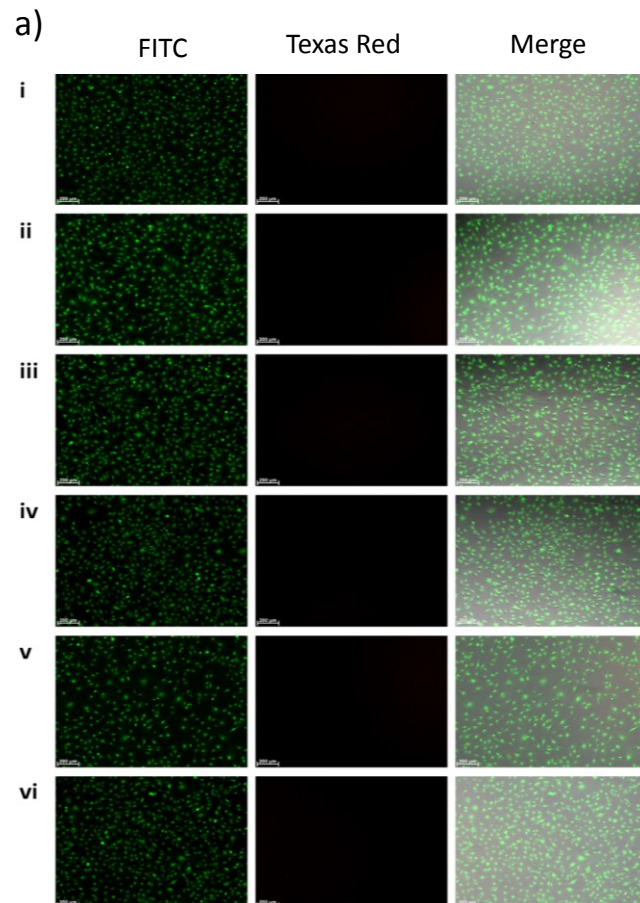


Figura 94. Vitalità cellulare percentuale di MC3T3-E1 incubate in presenza di HA-DETA e Ag1/HA-DETA_uv, Ag5/HA-DETA_uv, Ag10/HA-DETA_uv e Ag20/HA-DETA_uv dopo 24 e 48 ore

I dati MTS sono confermati dal saggio *Live and Dead*. Si evince che le cellule in presenza dei campioni sono vive indipendentemente dalla quantità di AgNO_3 di partenza utilizzato (Figura 95a e 95b).



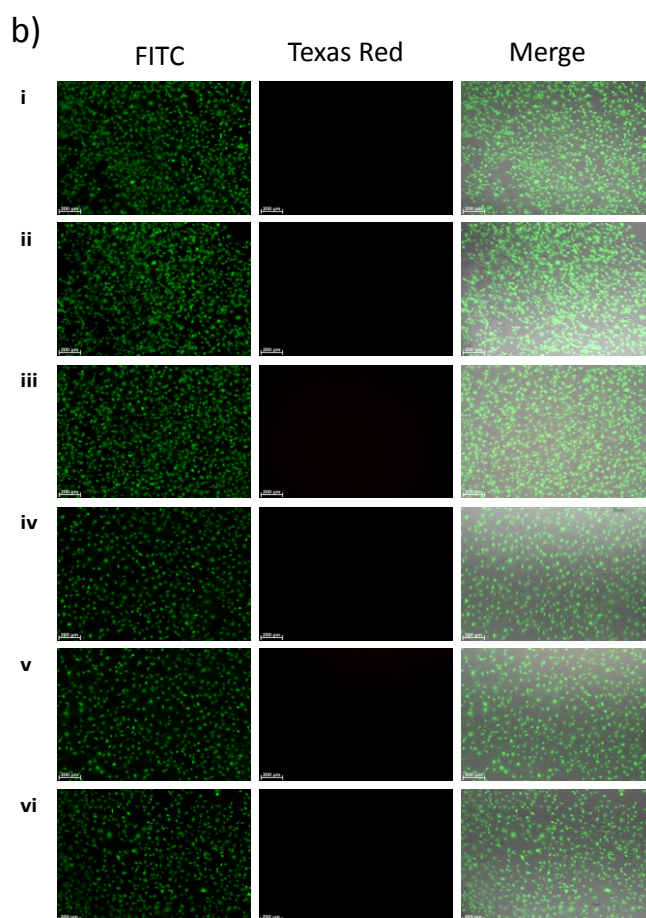


Figura 95. Immagini Live and dead delle cellule controllo (i) e dei campioni HA-DETA 33 (ii), Ag1/HA-DETA_uv (iii), Ag5/HA-DETA_uv (iv), Ag10/HA-DETA_uv (v), Ag20/HA-DETA_uv (vi) dopo (a) 24 e (b) 48 ore

3.3.20 Studi microbiologici: attività antibatterica ed antibiofilm

Le AgNPs non esercitano in modo significativo una tossicità specifica diretta sui batteri, ma forniscono ioni Ag^+ in grado di esplicare più efficacemente l'effetto sulla membrana e sul citoplasma dei batteri.

Preliminarmente sono stati effettuati studi per valutare la potenziale attività antibatterica del derivato HA-DETA₃₃. I risultati sono espressi in termini di Minima Concentrazione Inibente (MIC) in $\mu\text{g/ml}$ e sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7. Attività antibatterica del derivato HA-DETA₃₃ testata contro ceppi batterici patogeni (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *E. faecalis*) e ceppi fungini (*C.albicans*) a vita libera

Ceppi microbici	Minima concentrazione inibente (MIC) (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	>250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>250
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>250
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>250

Non si osserva attività antibatterica o antifungina a nessuna concentrazione saggiata (MIC > 250 µg/ml).

L'attività di inibizione della formazione dei biofilm del derivato HA-DETA₃₃ è riportata in Tabella 8. I dati sono espressi in termini di percentuale di inibizione a varie concentrazioni (µg/ml).

Tabella 8. Inibizione % della formazione del biofilm in presenza di HA-DETA₃₃

Ceppi batterici	Concentrazioni del polimero (µg/ml)				
	2.5	5	10	25	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<10%	15%	24.5%	34%	36%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	17%	21%	27.5%	31.8%	32%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<10%	25.8%	31%	36%	48,4%
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<10%	26%	29.8%	38%	41%

All'aumentare delle concentrazioni di polimero aumenta l'attività di inibizione del biofilm per tutti i ceppi batterici testati.

Dopo aver testato l'attività antibatterica e di inibizione del biofilm dell'HA-DETA₃₃ è stata valutata la MIC dei nanocompositi ottenuti per fotoreduzione UV contenenti AgNPs.

I risultati sono espressi in termini di MIC in % (v/v) e sono riportati in Tabella 9.

Tabella 9. Attività antibatterica testata contro ceppi batterici patogeni (*S. aureus*, *P. Aeruginosa* dei derivati

Ceppi microbici	Campioni			
	Ag1/HA-DETA_uv	Ag5/HA-DETA_uv	Ag10/HA-DETA_uv	Ag20/HA-DETA_uv
Staphylococcus aureus ATCC 25923	25%	12.5%	1.5%	<0.7%
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	25%	6.2%	0.7%	<0.7%

All'aumentare della concentrazione di AgNO₃ la MIC diminuisce mostrando quindi una maggiore attività antibatterica passando dal 25% per il campione Ag1/HA-DETA_uv a valori inferiori allo 0.7% per il campione Ag20/HA-DETA_uv.

La formazione di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* è stata esaminata in presenza e in assenza di nanoparticelle di argento. Tra i nanocompositi è stato selezionato e testato solo il nanocomposito Ag10/HA-DETA_uv. Un'esposizione al solo HA-DETA₃₃ non ha influenzato la vitalità in maniera significativa e non ha impedito la formazione di biofilm per entrambi i ceppi batterici (Figura 96 e 97). Il trattamento con Ag10/HA-DETA_uv ha comportato la diminuzione sia della massa del biofilm che della vitalità cellulare.

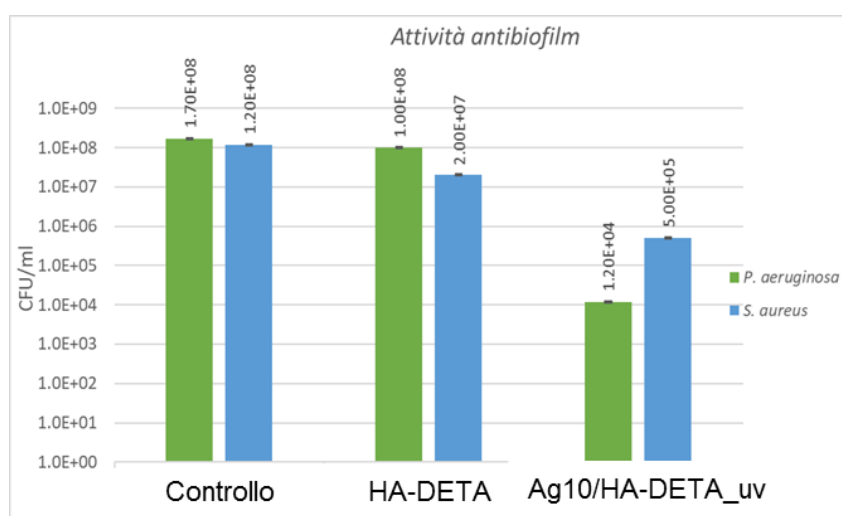


Figura 96. Metodo della conta vitale espressa in CFU/ml da biofilm di *P. aeruginosa* (verde) e *S. aureus* (blu) recuperato dopo deposizione dei ceppi in presenza di HA-DETA e Ag10/HA-DETA_uv

In particolare, l'HA-DETA₃₃ non ha determinato una diminuzione della biomassa del biofilm e dei conteggi delle cellule vitali con valori di CFU/ml simili alle cellule controllo del ceppo batterico mantenuto nelle stesse condizioni di crescita. Tuttavia, il campione Ag10/HA-DETA_{uv} ha permesso 4 riduzioni logaritmiche del numero di cellule (Figura 96) e la massa del biofilm risultava completamente disgregata come si nota dalla Figura 97. In particolare, sono stati osservati pochissimi aggregati cellulari dopo l'esposizione al derivato.

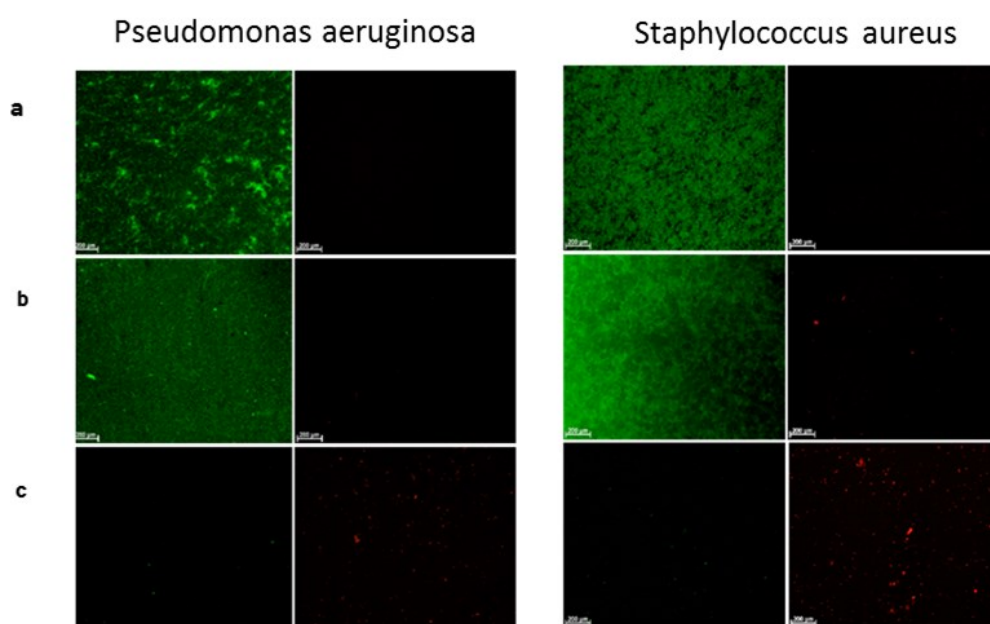


Figura 97. Immagini dopo trattamento con FDA e PI staining di *Pseudomonas aeruginosa* (sinistra) e *Staphylococcus aureus* (destra) del controllo (a); HA-DETA (b) e Ag10/HA-DETA_{uv} (c)

3.3.21 Preparazione degli idrogeli, studi di rilascio e test di diffusione su agar

L'Ag10/HA-DETA_{uv} è stato utilizzato per la produzione di idrogeli con nanoparticelle di argento dopo reticolazione con l'HA-Ald secondo lo schema in Figura 98.

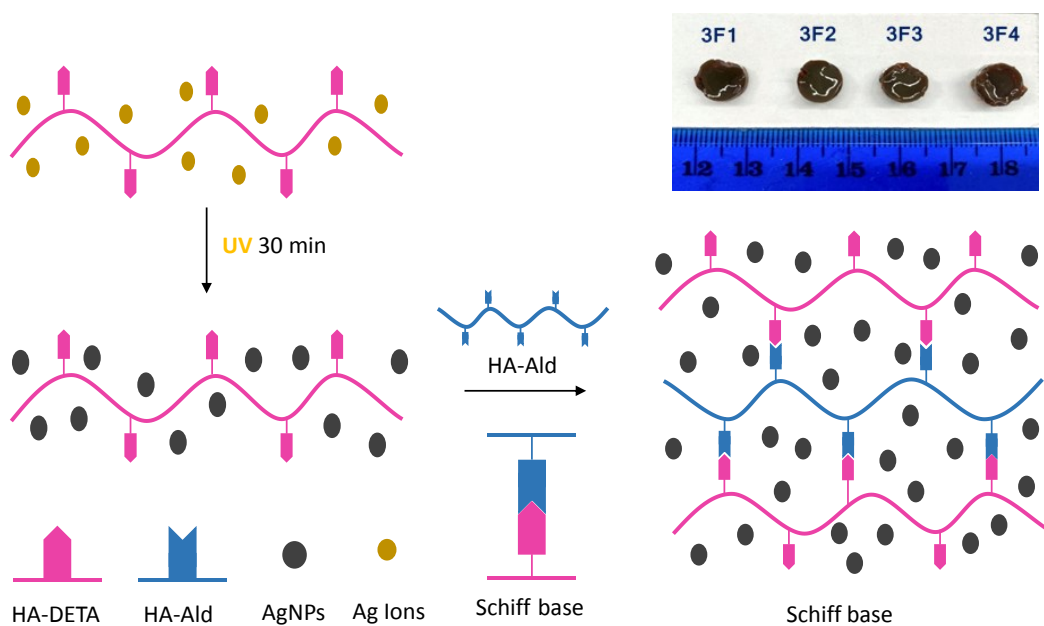


Figura 98. Illustrazione schematica della produzione degli idrogeli con AgNPs

Sono stati preparati 4 idrogeli con differenti rapporti molari aldeide/ammina e sono stati effettuati studi di rilascio di argento (Figura 99) e studi microbiologici preliminari attraverso il metodo di diffusione su agar (Figura 100).

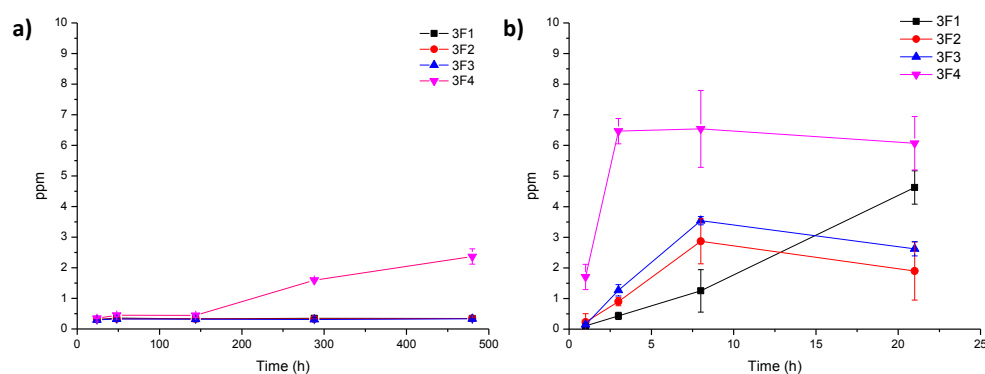


Figura 99. Studi di rilascio di argento dai geli in tampone fosfato pH 7.4 (a) e pH 5.5 (b)

I risultati dello studio di rilascio hanno confermato la pH sensibilità degli idrogeli prodotti, con un lento rilascio a pH neutro (figura 99a) mentre a pH 5.5 si osservava un rilascio massivo già dopo 3 ore per l'idrogel con rapporto molare CHO/NH₂ pari 0.3 (3F4) e un rilascio prolungato fino a 21 ore per gli altri idrogeli.

Dai risultati di diffusione su agar contro *P. Aeruginosa* si evidenzia come tutti gli idrogeli hanno mostrato attività antibatterica.

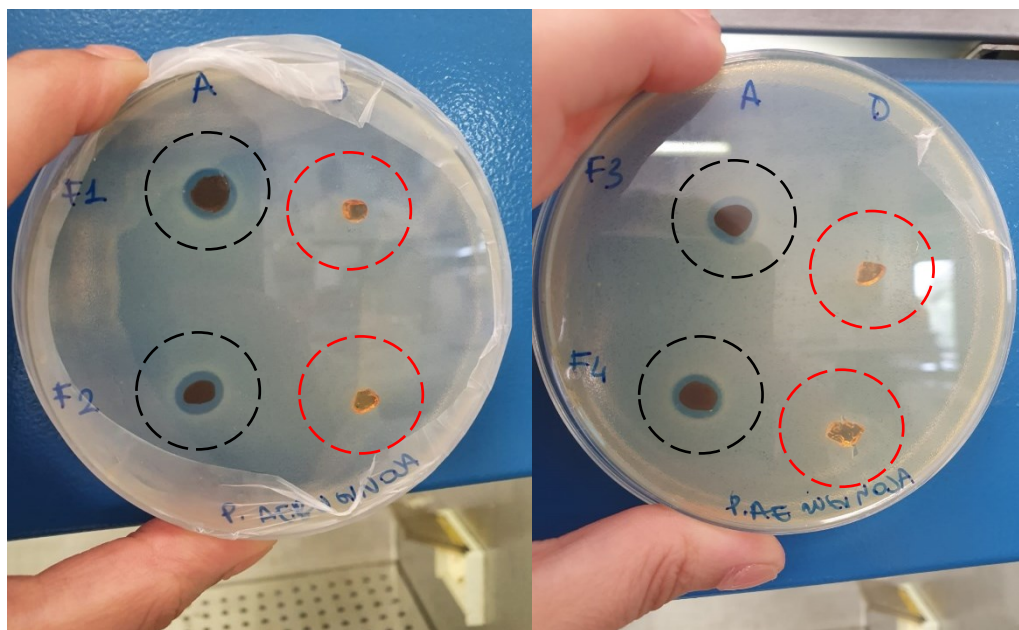


Figura 100. *P. Aeruginosa* incubato per 24h in presenza degli idrogeli con (nero) e in assenza di AgNPs (rosso)

3.4 Solvent-casting 3D printing di nuovi poliuretani con potenziale effetto rigenerativo del tessuto osseo e rilascio loco-regionale di doxorubicina

La reazione di sintesi dei poliuretani ha previsto il susseguirsi di tre step, partendo dalla sintesi dei copolimeri *tri-block*, polioli caratterizzati dalla presenza di PEG e PCL che costituiscono la porzione *soft*, seguita dall'aggiunta del diisocianato (BDI) che funge da segmento *hard*, ed infine del *chain-extender*, l'estere tetrametilico del L-glutamine ossidato (GSSG-OMe₄), per garantire l'allungamento della catena polimerica. Durante la sintesi dei copolimeri *tri-block*, sono stati utilizzati diversi rapporti molari tra ϵ -caprolattone (ϵ -CL) e PEG a diverso peso molecolare, per valutare l'influenza del copolimero *tri-block* sulle proprietà chimico-fisiche del derivato poliuretano finale.

3.4.1 Sintesi dei copolimeri *tri-block*

La sintesi dei copolimeri *tri-block* si basa sulla *Ring Opening Polymerization* (Guan, et al., 2004) e come mostrato in Figura 101, la reazione consiste nell'apertura dell'anello dell' ϵ -caprolattone (ϵ -CL) ad opera del gruppo ossidrilico del polietilenglicole.

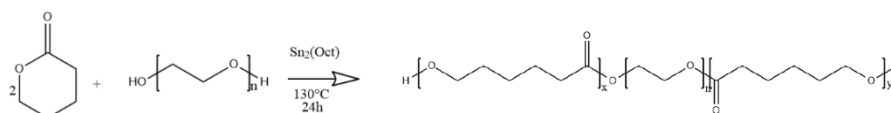


Figura 101. Schema della Ring Opening Polymerization

Sono stati sintetizzati quattro copolimeri *tri-block* differenti che sono stati identificati con le sigle **PolyC₁₂E_{1k}**, **PolyC₂₄E_{1k}**, **PolyC₁₂E_{2k}**, **PolyC₂₄E_{2k}**, utilizzando PEG 1000 e PEG 2000 rispettivamente con *feed-ratio* di 12.26 e 24.52.

I prodotti sono stati caratterizzati tramite analisi SEC per valutarne il peso molecolare (M_n e M_w) e l'indice di polidispersità (IPD). In Tabella 10 sono espressi i valori ottenuti.

Tabella 10. Peso molecolare medio numerico (M_n) e medio pesato (M_w) ed indice di polidispersità (PDI) dei copolimeri *tri-block* ottenuti dall'analisi Size Exclusion Chromatography (SEC)

	<i>PolyC₁₂E_{1k}</i>	<i>PolyC₂₄E_{1k}</i>	<i>PolyC₁₂E_{2k}</i>	<i>PolyC₂₄E_{2k}</i>
M_n	1399	3971	2270	3721
M_w	1520	4083	2968	4151
PDI	1.086	1.028	1.071	1.115

Dall'analisi dei dati riportati in tabella, si nota come, a parità di peso molecolare di PEG utilizzato, il peso complessivo dei copolimeri *tri-block* aumenta in accordo all'incremento di *feed-ratio* di ϵ -CL utilizzato, raggiungendo valori che risultano in accordo al valore teorico di peso molecolare che si ottiene considerando i *feed-ratio* utilizzati, almeno per i copolimeri *PolyC₁₂E_{1k}*, *PolyC₂₄E_{1k}* e *PolyC₁₂E_{2k}*, mentre il copolimero *PolyC₂₄E_{2k}* mostra un valore di M_n significativamente più basso rispetto al valore teorico calcolato.

Tramite analisi FT-IR è stato possibile valutare qualitativamente la presenza dei gruppi funzionali tipici del PEG e del PCL.

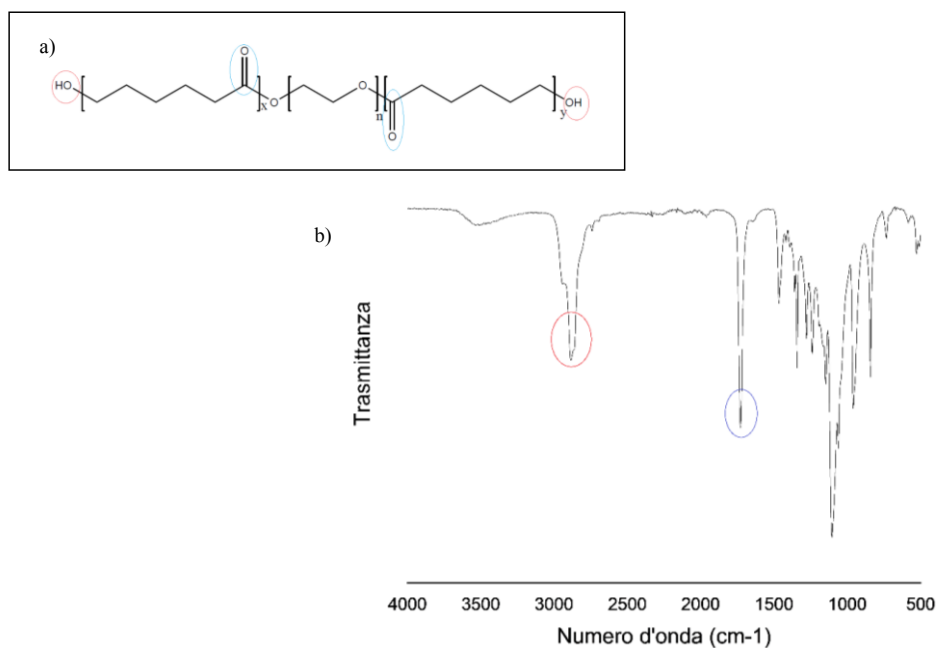


Figura 102. (a) Struttura generale ed esemplificativa dei copolimeri *tri-block* per l'analisi FT-IR. (b) Spettro FT-IR del *PolyC₂₄E_{1k}*

In particolare la banda a 3000 cm^{-1} , visibile in Figura 102b, può essere associata allo stretching degli OH terminali dei copolimeri *tri-block*, mentre la banda a 1750 cm^{-1} è associata allo stretching dell'estere, i gruppi funzionali sono visibili in figura 102a, cerchiati rispettivamente in rosso e in blu.

Il grado di funzionalizzazione in PCL è stato valutato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ da cui è stato possibile fare anche una stima del PM dei copolimeri *tri-block*.

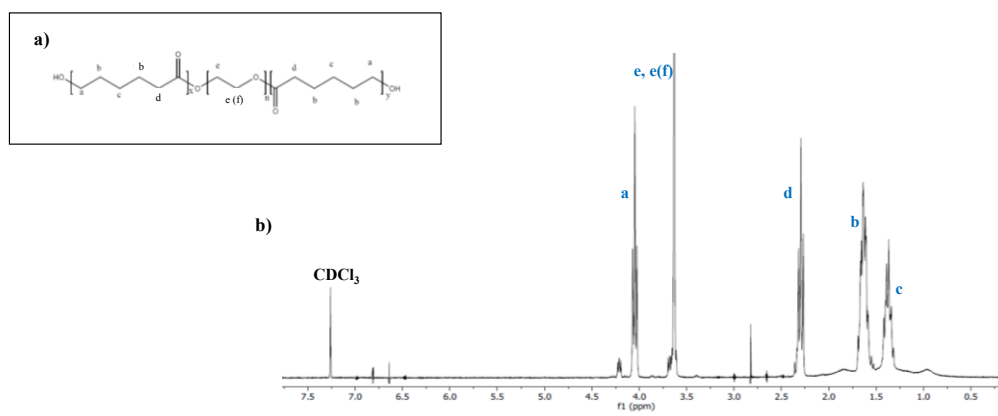


Figura 103. (a) Struttura generale ed esemplificativa dei copolimeri *tri-block* per l'analisi $^1\text{H-NMR}$. (b) Spettro $^1\text{H-NMR}$ PolyC24E1k

Nella Figura 103b, a scopo esemplificativo, è riportato lo spettro di uno dei copolimeri sintetizzati (PolyC₂₄E_{1k}). Il picco a 3.63 ppm (indicato con *e* ed *e(f)* nella struttura riportata in Figura 103a, è attribuibile al PEG, mentre i picchi a 4.21, 2.28, 1.64 e 1.37 sono attribuibili al PCL, (picchi *a*, *d*, *b* e *c* riportati in Figura 102a).

Poiché è noto il peso molecolare del PEG, è stato possibile calcolare il peso molecolare di tutti i copolimeri sintetizzati utilizzando il rapporto dell'area del picco del PEG a 3.63 e del PCL a 1.64 e 1.37 ppm (rispettivamente 90.92 H^+ e 6 H^+), ottenendo i valori riportati in Tabella 11. I valori riportati, sono in accordo con i valori teorici ricavati considerando i *feed-ratio* di ϵ -caprolattone utilizzati. Confrontando i valori teorici ricavati dall'analisi $^1\text{H-NMR}$, con i valori ottenuti tramite SEC, si osserva come i pesi ottenuti tramite analisi cromatografica siano più bassi, anche se l'andamento generale dovuto all'eccesso di ϵ -caprolattone utilizzato viene rispettato. Questa apparente discrepanza, potrebbe essere dovuta al diverso arrangiamento che i *coils* di copolimero potrebbero assumere nel mezzo di eluizione al variare della lunghezza delle porzioni idrofobiche/idrofiliche e alla loro plausibile differente termosensibilità.

Tabella 11. Pesi molecolari dei copolimeri tri-block valutati tramite analisi $^1\text{H-NMR}$

<i>Copolimero tri-block</i>	<i>Feed-Ratio</i> (mol _{ecpl} /mol _{PEG})	<i>Lunghezza della catena</i> PCL-PEG-PCL
<i>PolyC₁₂E_{1k}</i>	12.26	596.7- 1000 -596.7
<i>PolyC₂₄E_{1k}</i>	24.52	2049.6- 1000 -2049.6
<i>PolyC₁₂E_{2k}</i>	12.26	1040.9- 2000 -1040.9
<i>PolyC₂₄E_{2k}</i>	24.52	2198.6- 2000 -2198.6

3.4.2 Sintesi del chain extender

Per garantire l'allungamento della catena polimerica, come *chain extender*, è stato sintetizzato il tetrametilestere dell'L-glutatione ossidato (GSSG-OMe₄). L'esterificazione del tripeptide è utile ad evitare un'eventuale competizione tra i quattro gruppi carbossilici del glutazione ossidato e i gruppi ossidrili dei copolimeri *tri-block* nella reazione con i gruppi isocianato liberi, questo impedirebbe quindi il corretto allungamento della catena polimerica.

L'esterificazione, inoltre, ne garantisce la solubilità in N,N-Dimetilformammide, solvente utilizzato nella reazione di sintesi dei polimeri.

La sintesi ha previsto il trattamento dell'L-glutatione ossidato con trimetilclorosilano, come agente clorurante, e metanolo sia come alcol, per la reazione di esterificazione, che come solvente; la schematizzazione della reazione è riportata in Figura 104.

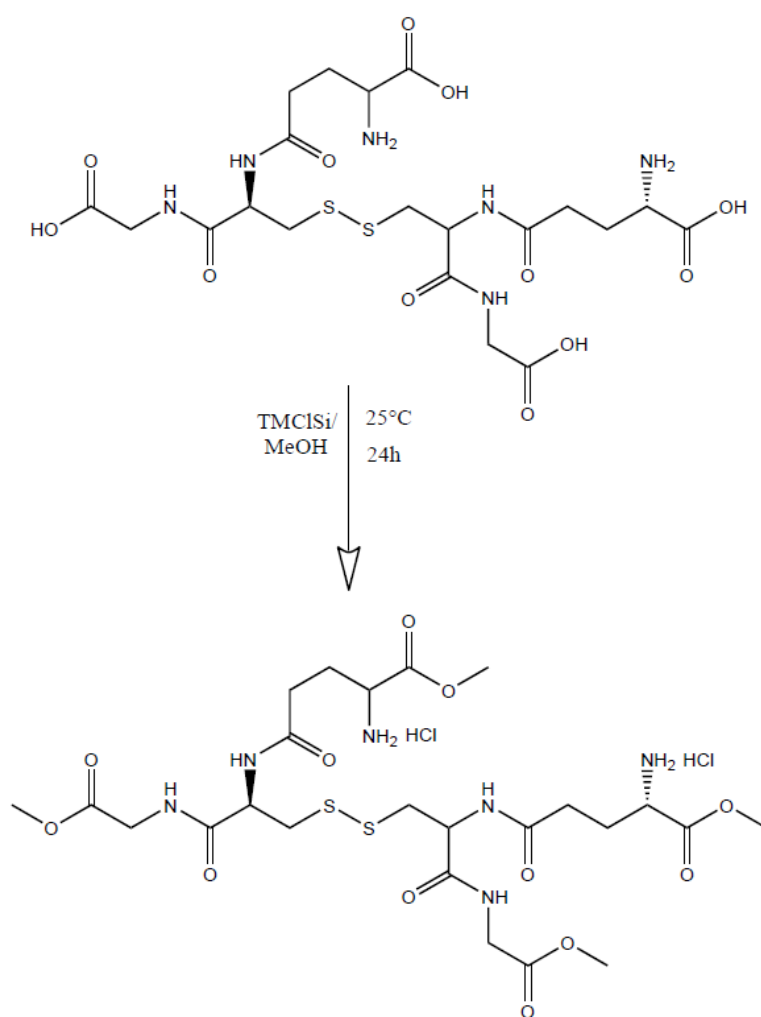


Figura 104. Sintesi del Chain Extender: reazione di esterificazione

3.4.3 Caratterizzazione del tetramilestere dell'*L*-glutazione ossidato

Lo spettro FTIR del derivato estereo del GSSG-OMe₄ è riportato in Figura 105, in comparazione con lo spettro del glutathione di partenza (GSSG). Nello spettro del GSSG-OMe₄ la banda a 2941 cm⁻¹ può essere attribuita allo stretching del gruppo NH³⁺, mentre lo *shift* della banda a 1741 cm⁻¹ conferma la presenza degli esteri. I due picchi a 1439 cm⁻¹ e 1216 cm⁻¹ possono essere attribuiti ai doppi legami (O=COC) e ai legami esterei (COO-C), rispettivamente.

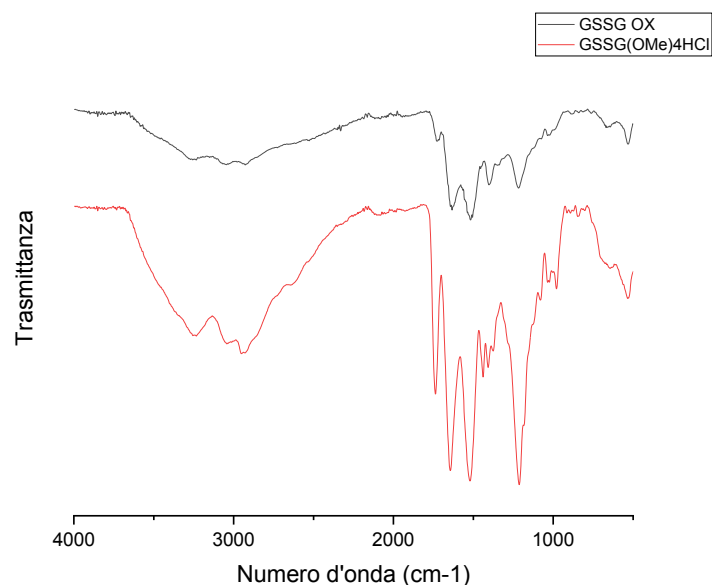


Figura 105. Spettro FT-IR del glutatione ossidato (in nero) e dell'estere tetrametilico del glutatione ossidato (in rosso)

Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ riportato in Figura 106, è possibile attribuire i picchi a 3.73 e 3.86 ppm (12 H^+) ai protoni del gruppo metilenico esterificato.

La percentuale di esterificazione, calcolata rapportando le aree dei picchi a 3.86 e 3.73 ppm rispetto all'area dei picchi a 2.59 e 2.22 ppm della porzione del glutammato del glutatione (8H^+), è risultata essere pari al 90%.

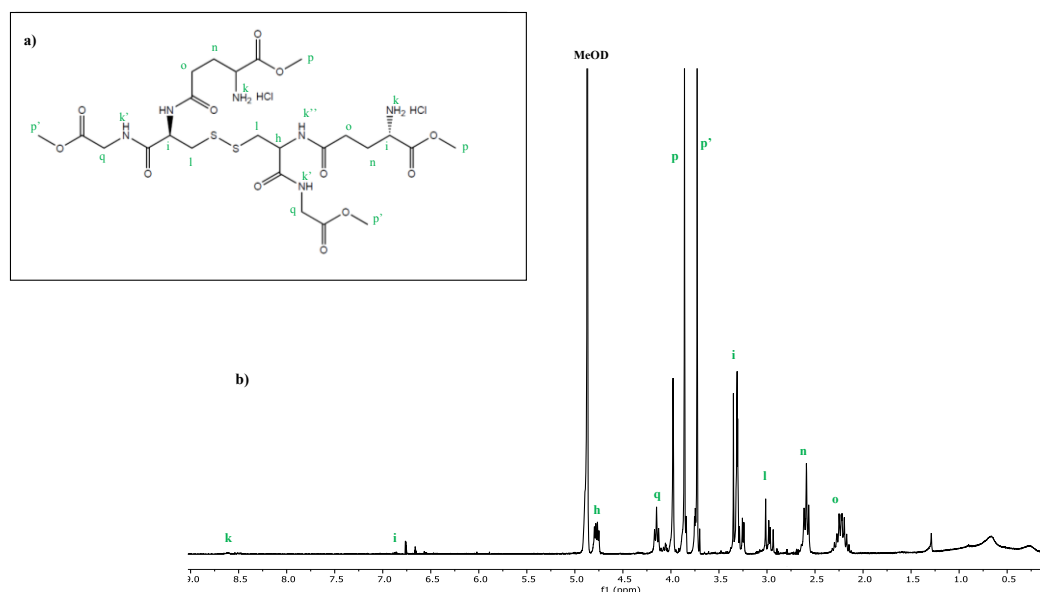


Figura 106. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del $\text{GSSG}(\text{OMe})_4\text{HCl}$

3.4.4 Sintesi dei poliuretani

La procedura sintetica ha previsto il susseguirsi di tre step, con condizioni operative differenti. Sono stati utilizzati i quattro copolimeri PolyC₁₂E_{1k}, PolyC₂₄E_{1k}, Poly₁₂CE_{2k} e Poly₂₄CE_{2k}, come segmenti *soft*, per studiare le diverse proprietà che, in funzione del rapporto molare tra PCL e PEG, conferiscono al derivato poliuretano finale; il butildiisocianato (BDI) ed il tetrametilestere dell'L-glutazione ossidato, come estensore di catena, costituiscono il segmento *hard*. L'azoto nucleofilo dei gruppi amminici del GSSG-OMe₄, attaccando i carboni elettrofili dei gruppi isocianato terminali delle catene polimeriche costituite dai copolimeri *tri-block* e dal BDI, fa sì che il *chain extender* funga da ponte tra due catene, permettendo così di allungare la catena polimerica.

La reazione è schematizzata in Figura 107.

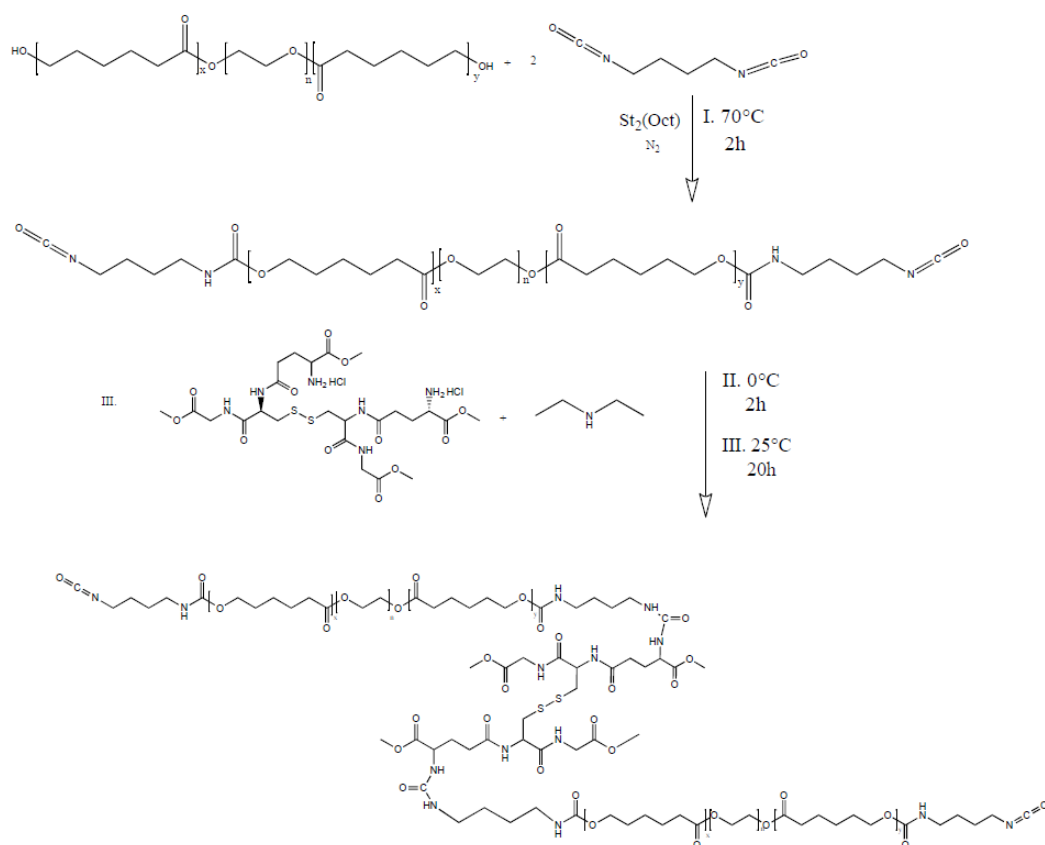


Figura 107. Sintesi schematica dei poliuretani

I prodotti ottenuti dai quattro copolimeri *tri-block* sono stati denominati come: **PolyC₁₂E_{1k}GS**, **PolyC₂₄E_{1k}GS**, **PolyC₁₂E_{2k}GS**, **PolyC₂₄E_{2k}GS**.

La resa in peso dei vari prodotti è riportata nella Tabella 12.

Tabella 12. Resa dei prodotti

Prodotto	PolyC ₁₂ E _{1k} GS	PolyC ₂₄ E _{1k} GS	PolyC ₁₂ E _{2k} GS	PolyC ₂₄ E _{2k} GS
Resa %	37.9% ± 1.41	76% ± 0.70	68% ± 2.12	81.8% ± 0.70

Lo stato fisico dei prodotti ha nettamente influenzato la resa, infatti essendo il PolyC₁₂E_{1k}GS fluido alla temperatura di precipitazione rispetto agli altri tre derivati che, invece, erano in forma solida, la sua separazione è stata più difficoltosa, con una resa molto bassa.

3.4.5 Caratterizzazione chimico fisica dei PolyCEGS

La caratterizzazione dei prodotti ha previsto inizialmente la valutazione del peso molecolare e dell'indice di polidispersità tramite *Size Exclusion Chromatography*. I valori sono riportati in Tabella 13. Allo scopo di avere un parametro che consentisse di valutare l'efficienza della fase di estensione di catena, è stato calcolato il grado di estensione **R**, espresso come il rapporto tra il peso molecolare medio numerico del poliuretano (M_n PolyCEGS) ed il peso molecolare medio numerico dei copolimeri di partenza (M_n PolyCE).

Tabella 13. Pesi molecolari dei poliuretani (M_n e M_w), indice di polidispersità (PDI) e grado di estensione (R) ottenuti tramite *Size Exclusion Chromatography*

	PolyC ₁₂ E _{1k} GS	PolyC ₂₄ E _{1k} GS	PolyC ₁₂ E _{2k} GS	PolyC ₂₄ E _{2k} GS
M_n	17556	20416	23750	46594
M_w	23763	29876	36046	84216
PDI	1.30	1.46	1.50	1.80
R	12	5	8	12

Il peso molecolare dei derivati cresce in accordo al *feed-ratio* in ϵ -caprolattone. Il grado di polimerizzazione suggerisce una maggiore efficienza di polimerizzazione per i derivati PolyC₁₂E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{2k}GS, anche se quest'ultimo presenta una maggiore differenza dimensionale paragonando M_n con M_w.

L'analisi FTIR è stata condotta su tutti e quattro i derivati PolyCEGS. La Figura 108 riporta, a scopo esemplificativo, lo spettro del derivato PolyC₂₄E_{1k}GS confrontato con il copolimero *tri-block* di partenza.

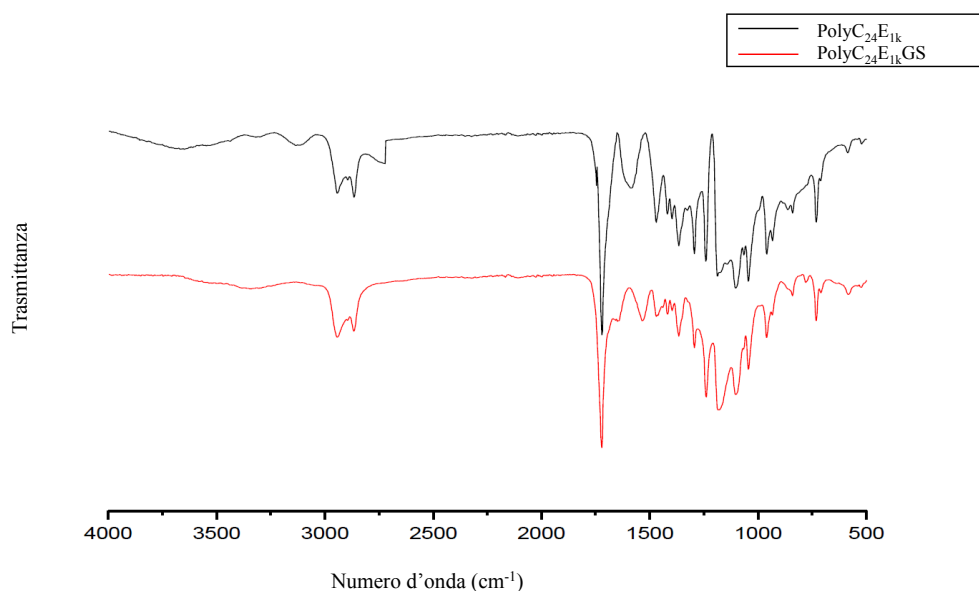


Figura 108. Spettro FTIR, confronto tra PolyC₂₄E_{1k} e PolyC₂₄E_{1k}GS

La banda a 1646 cm⁻¹ è relativa allo stretching del gruppo carbonilico, mentre i picchi a 1238 e 1100 cm⁻¹ possono essere attribuiti allo stretching asimmetrico del gruppo O-C-C dei blocchi di PCL. Le bande a 2870 and 2933 cm⁻¹ sono attribuibili agli stretching asimmetrici dei metileni del poliuretano.

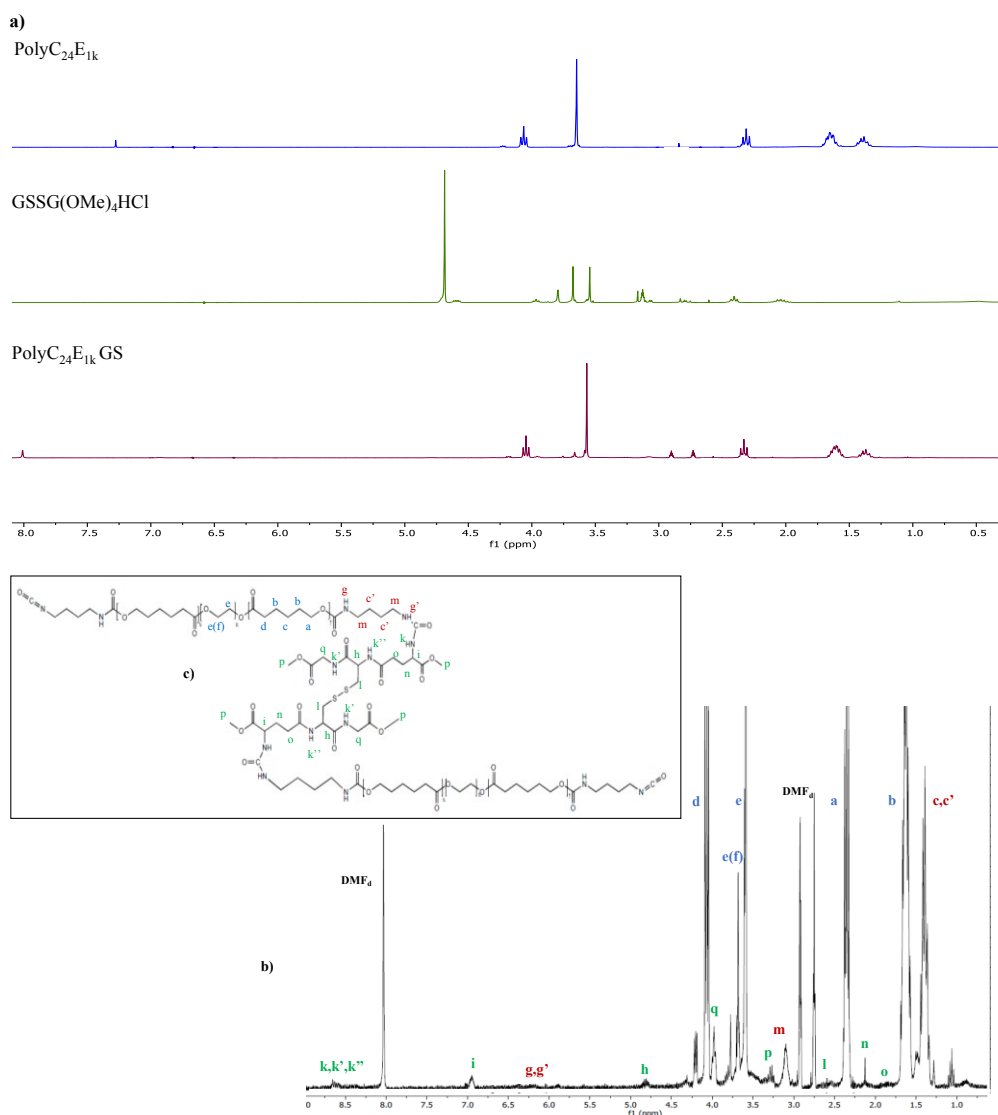


Figura 109. a) Struttura esemplificativa del PolyCEGS, b) spettro $^1\text{H-NMR}$ del PolyC₂₄E_{1k}GS in DMF_d, c) confronto tra gli spettri $^1\text{H-NMR}$ del PolyC₂₄E_{1k}, del GSSG(OMe)₄HCl e del PolyC₂₄E_{1k}GS

La Figura 108, riporta la sovrapposizione degli spettri $^1\text{H-NMR}$ del derivato PolyC₂₄E_{1k}GS con il prepolimero di partenza e del GSSG-OMe₄ (Figura 109a), lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato PolyC₂₄E_{1k}GS (Figura 109b), mentre in Figura 109c è riportata la formula di struttura del poliuretano con l'indicazione della corrispondenza dei protoni con i picchi dell' $^1\text{H-NMR}$. In particolare, il picco a 3.59 ppm è stato attribuito ai protoni metilenici del PEG; il picco a 3.10 ppm corrisponde ai 4 protoni del tetrametilestere, i picchi a 1.62 e 1.28 ppm ai 6 protoni totali della porzione di PCL, mentre il picco a 1.50 ai 4 protoni del BDI.

Il comportamento termico dei polimeri è stato valutato tramite calorimetria a scansione differenziale (DSC), in un range di temperatura compreso tra -100°C e + 100°C, con una velocità di riscaldamento di 5 gradi/min.

Tabella 14. Dati ottenuti dall'analisi termica (DSC)

	T_g - °C	T_f - °C	ΔH_f - J/g
PolyC₁₂E_{1k}GS	/	-26.036	12.033
PolyC₂₄E_{1k}GS	-44.966	51.033	72.05
PolyC₁₂E_{2k}GS	-38.632	28.544	27.143
PolyC₂₄E_{2k}GS	-46.751	45.456	46.58

Nella Tabella 14 sono riportati i valori di temperatura di transizione gel-cristallo liquido (T_g), temperatura di fusione (T_f) ed entalpia di fusione (ΔH_f) registrati per i 4 derivati poliuretanicici sintetizzati. Le transizioni registrate a basse temperature sono state attribuite alle transizioni vetroso-gommose delle porzioni soft dei copolimeri e le transizioni ad alta temperatura alle transizioni di fusione delle stesse porzioni soft (Guan, et al., 2004). Il poliuretano PolyC₁₂E_{1k}GS presenta un punto di fusione di -26°C. A parità di peso molecolare di PEG si riscontra un incremento delle temperature e delle entalpie di fusione all'aumentare del *feed-ratio* utilizzato.

La quantificazione dei gruppi S-S presenti nella porzione GSSG-OMe₄ è stata effettuata secondo la procedura riportata nel *saggio di Thannhauser* (Thannhauser, et al., 1987) per l'analisi di legami disolfuro in peptidi e proteine. I valori sono stati espressi come μmol di gruppi S-S/g di prodotto e sono riportati in Figura 110. La quantità dei ponti disolfuro, e quindi di GSSG-OMe₄, è risultata essere maggiore per il poliuretano PolyC₁₂E_{1k}GS in accordo ad una maggiore reattività, dovuta al minore peso molecolare del copolimero PolyCE di partenza e ad una ridotta cristallizzazione delle catene di PCL durante la fase di raffreddamento a 0°C che si effettua prima della fase di estensione di catena.

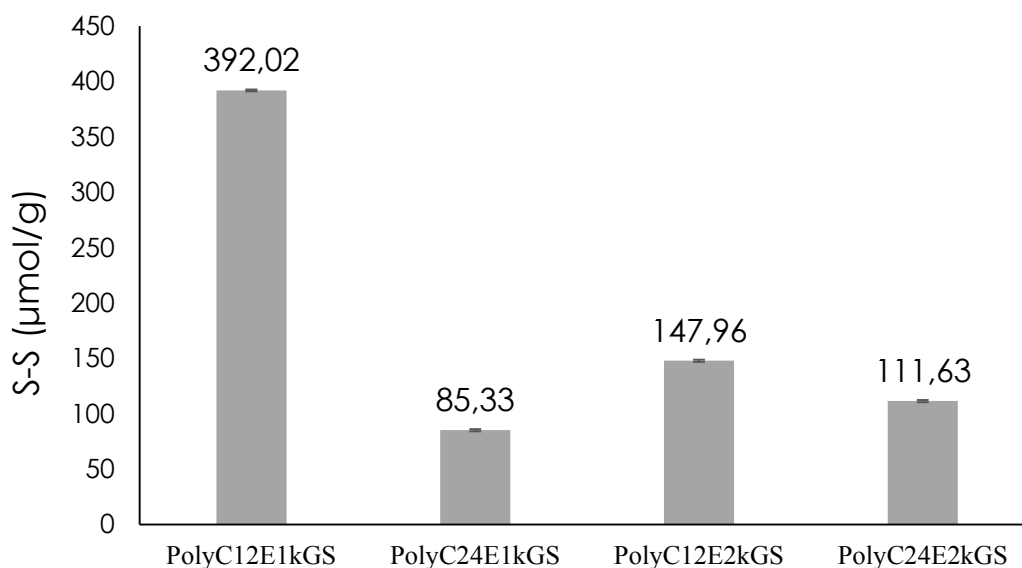


Figura 110. Grafico dei dati di quantificazione dei ponti disolfuro

3.4.6 Studi di degradazione e swelling su films di PolyC₂₄E_{1k}GS

Lo studio di degradazione idrolitica sui *films* di PolyC₂₄E_{1k}GS, ottenuti mediante la tecnica del *film-casting*, è stato condotto in DPBS a pH 7.4, con e senza l'aggiunta di glutatione ridotto (GSH) 10 mM, allo scopo di mimare una ambiente riducente. Dopo 75 giorni si è registrata una perdita in peso complessiva del 7% e non è stata registrata una differenza statisticamente significativa fra tutti i tempi analizzati e per entrambi i mezzi utilizzati (Figura 111). Questo dato preliminare, da una parte suggerisce l'elevata resistenza idrolitica del poliuretano selezionato, che è un requisito fondamentale per un polimero che debba fungere da materiale impiantabile per sostenere un'attività prolungata nel tempo, dall'altra evidenza che la stimolazione in ambiente riducente non determina una variazione della resistenza idrolitica del materiale. Inoltre l'analisi della capacità di *swelling* nel tempo conferma una buona affinità al mezzo acquoso, dovuta alla presenza del PEG nel copolimero *tri-block*, che rimane stabile nel tempo, in accordo con i dati di degradazione idrolitica.

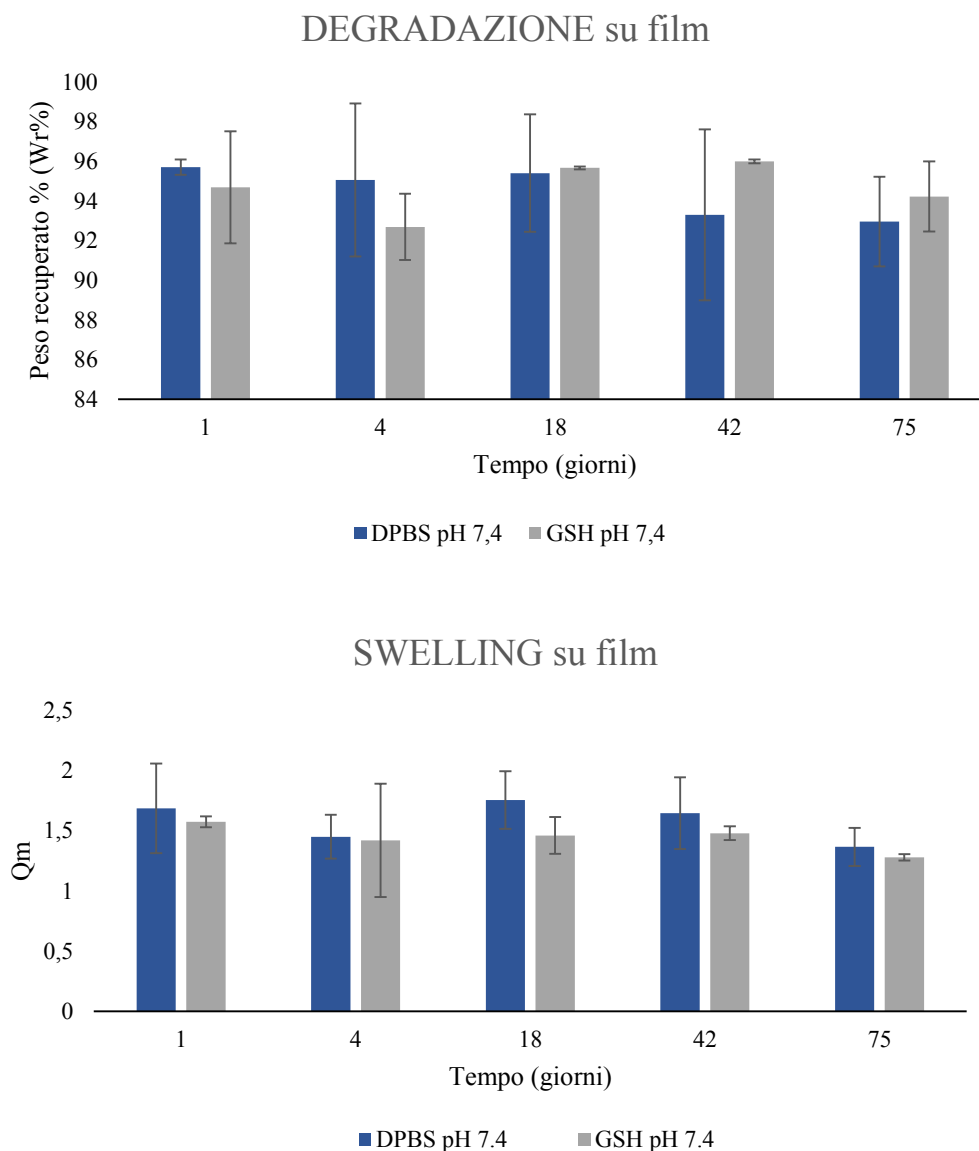


Figura 111. Studi di degradazione e swelling sui films di PolyC24E1kGS ottenuti tramite film-casting in DCM

3.4.7 Stampa 3D e modello digitale

Approcci recenti per l'ingegneria del tessuto osseo, si concentrano sulla progettazione di *scaffold* osteoinduttivi senza cellule (Chen, et al., 2019), in cui sono incorporati nanofiller inorganici per migliorare le prestazioni meccaniche e conferire proprietà osteoinduttive. Tali particelle colloidali interagiscono con il polimero stabilendo interazioni, rafforzando così l'*entanglement* della rete polimerica.

Nella progettazione di *scaffolds* meccanicamente performanti, le nanoparticelle inorganiche costituite da idrossiapatite, grazie alla loro somiglianza con i composti inorganici della matrice extracellulare dell'osseo naturale, sono ampiamente utilizzate come agente dopante nanostrutturato osteoinduttivo. Partendo da questi presupposti, allo scopo di progettare materiali con potenziale attività osteoinduttiva, è stata valutata la possibilità di dopare gli *scaffolds* di poliuretano con nanoparticelle di idrossiapatite (nHAp). La stampabilità della matrice polimerica, con e senza nanoparticelle di idrossiapatite (nHAp) è stata saggiata progettando una griglia 3D di base. In particolare il modello digitale, come file STL, è stato progettato come una griglia a 3 strati, dalle dimensioni di 10 x 10 x 1.2 mm, con un diametro del filamento di 0.4 mm, una distanza del filamento di 0.8 mm e un *laydown pattern* di 90°.

Il file è stato poi convertito in GCODE e il risultato dell'immagine digitale è mostrato in Figura 112.

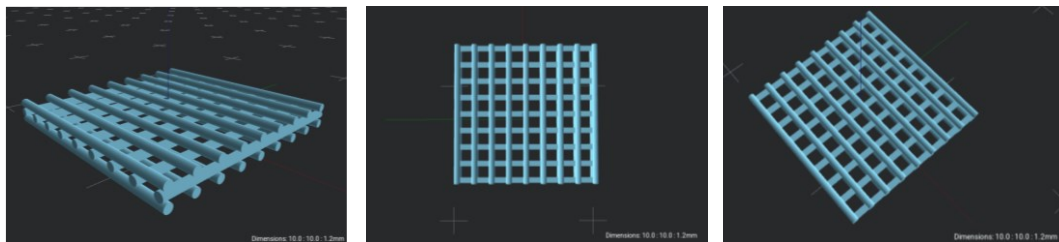


Figura 112. Rendering dello scaffold 3D

Il derivato poliuretano migliore, grazie alla sua disperdibilità in DCM ed alle sue ottimali caratteristiche fisiche è risultato essere il PolyC₂₄E_{1k}GS.

Per la stampa del poliuretano è stata seguita la tecnica del *solvent-casting*; le dispersioni di PolyC₂₄E_{1k}GS in DCM e di PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp in DCM, sono state caricate in siringa e stampate dopo aver standardizzato le condizioni di stampa (Figura 113).

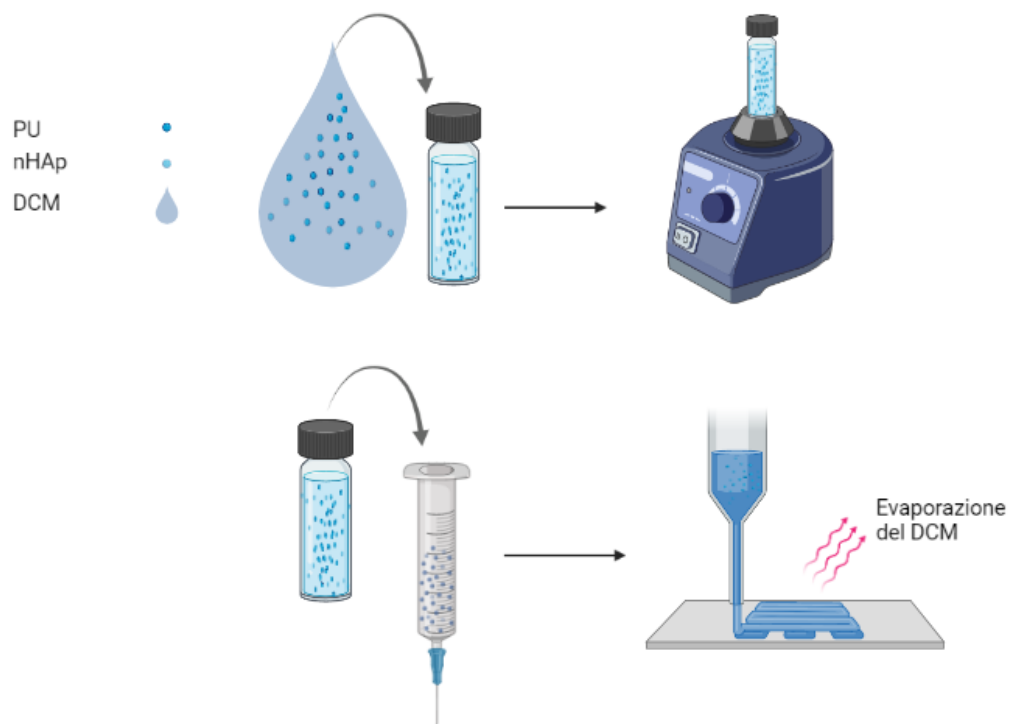


Figura 113. Tecnica del solvent-casting eseguita per la stampa del PolyC24E1kGS

In particolare, sono state testate diverse concentrazioni percentuali in peso di poliuretano, a differenti pressioni e velocità di stampa. Dopo diversi tentativi di stampa effettuati variando la concentrazione di poliuretano (Figura 114b), le condizioni operative migliori sono state ottenute al 20% p/p, con una pressione di stampa pari a 8000 mbar ed una velocità di stampa di 1 mm/s, con un ago di 27 G. La Figura 114a riporta l'immagine del filamento ottenuto. Il filamento generato, ha la consistenza idonea ad essere depositato strato su strato ed è in grado di solidificare rapidamente dopo la deposizione a seguito all'evaporazione del DCM, come mostrato in Figura 114.

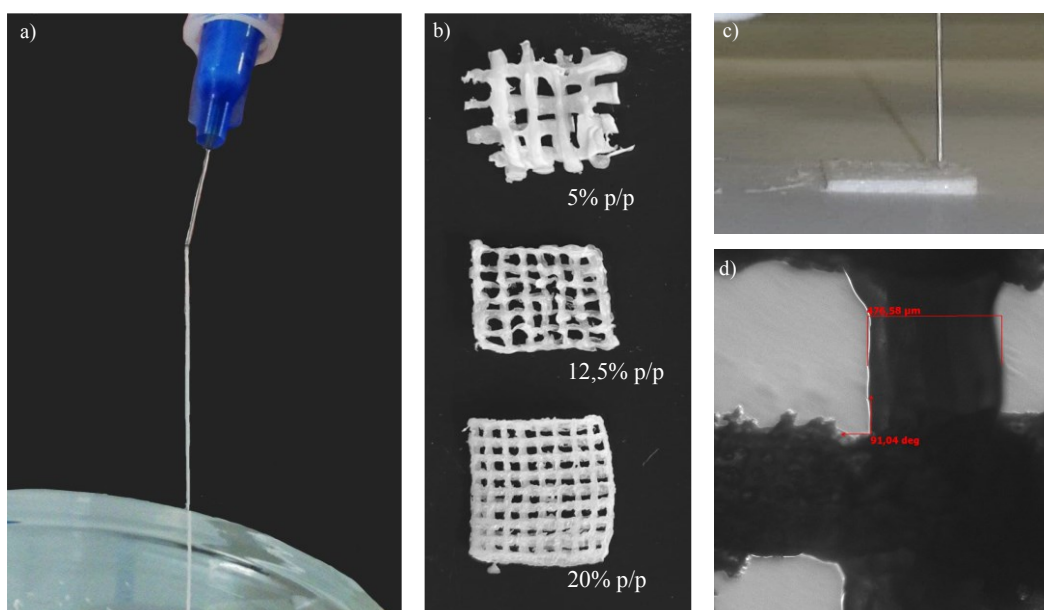
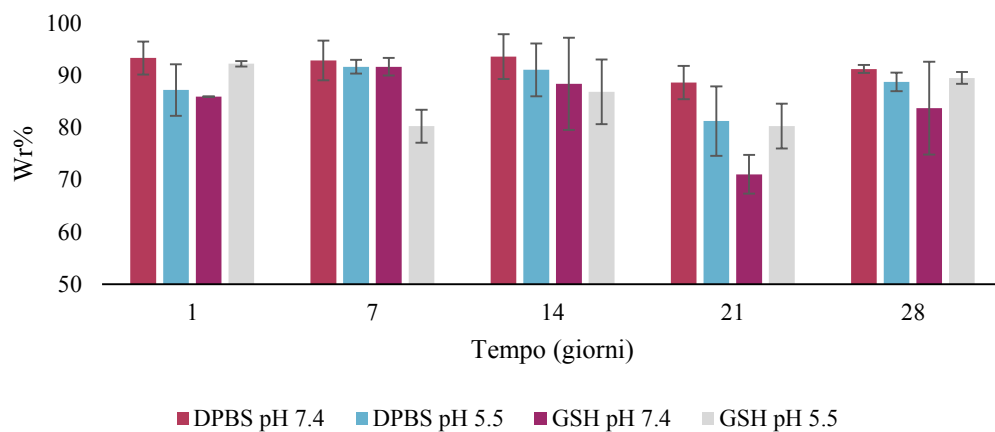


Figura 114. (a) Filamento del PolyC24E1kGS; (b) stampa a diverse concentrazioni percentuali di PolyC24E1kGS; (c) scaffold durante la stampa; (d) dimensioni del filamento e angolo della griglia visualizzati tramite microscopio ottico

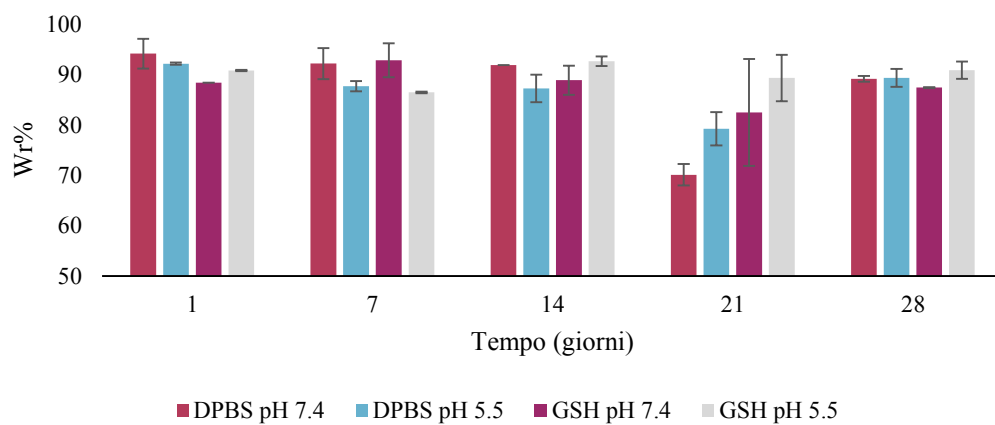
3.4.8 Studi di degradazione e di swelling su scaffolds stampati

Gli studi di *swelling* e degradazione idrolitica sono stati eseguiti anche sugli *scaffolds* stampati, come riportato in Figura 115. Dal grafico, è possibile notare come, fino a 28 giorni non si riscontra alcuna differenza significativa tra l'entità di idrolisi, comparando gli *scaffolds* con e senza nHAp, in tutti i mezzi di dispersione saggiati, indicando che la presenza di dopante non peggiora la stabilità a lungo termine del poliuretano. Una differenza significativa, invece, si riscontra in termini di rigonfiamento degli *scaffolds* dal 14° giorno, nelle matrici prive di nHAp che rigonfiano significativamente nel mezzo addizionato di GSH in particolare a pH 7.4. A tale aumento significativo dello swelling non corrisponde però un aumento dell'entità di idrolisi delle matrici. La presenza di nanoparticelle incrementa la stabilità degli *scaffolds* che mantengono una capacità di rigonfiamento stabile nel tempo.

DEGRADAZIONE PolyC₂₄E_{1k}GS



DEGRADAZIONE PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp



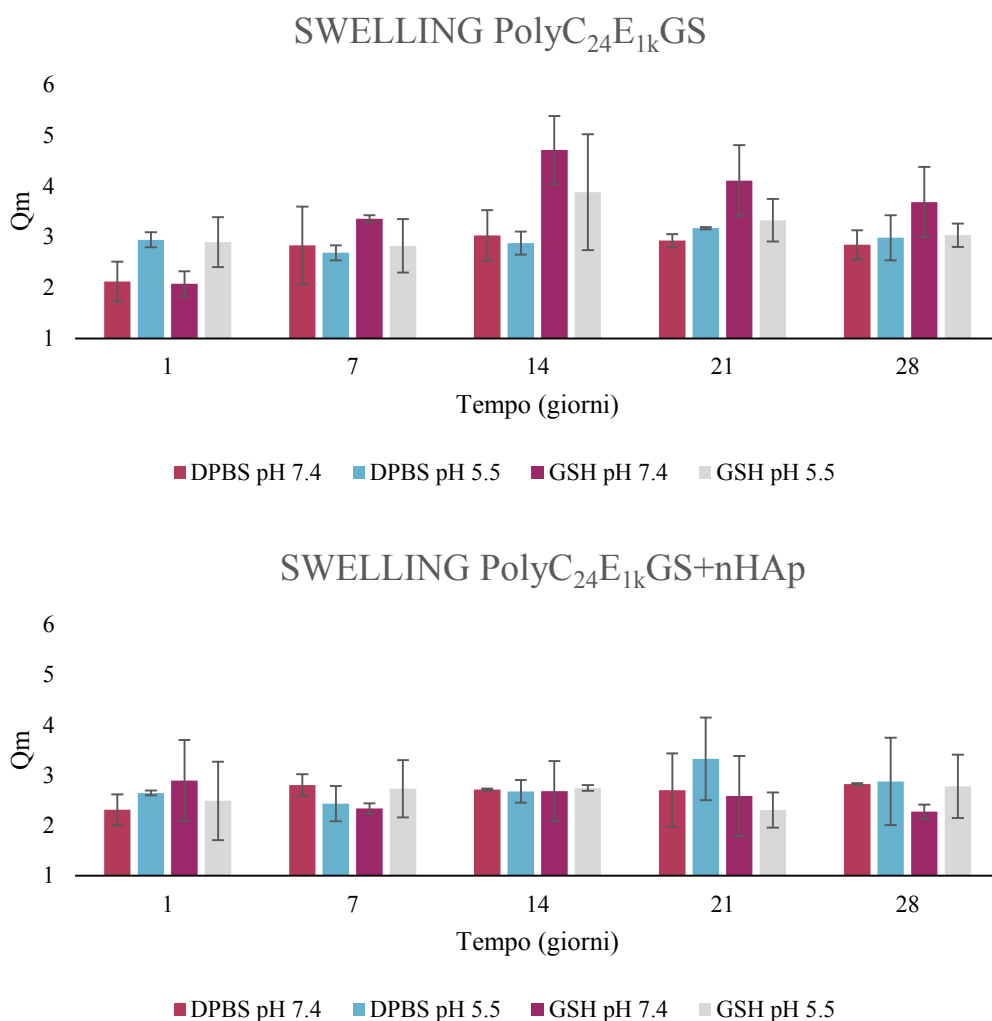


Figura 115. Studio di degradazione e swelling su scaffolds stampati

3.4.9 Studi di citocompatibilità in vitro

La Figura 116A riporta le immagini registrate al microscopio a fluorescenza delle cellule MC3T3-E1, trattate con la tecnica *live and dead*. Il test di adesività degli osteoblasti, sui filamenti degli *scaffolds* (Figura 116A, riquadri *a* e *d*), suggerisce che il PolyC₂₄E_{1k}GS con e senza nHAp non è tossico ma è scarsamente adesivo per le cellule utilizzate. L'ottimale profilo di citocompatibilità è confermato anche dai test di citocompatibilità indiretta, condotte sulle cellule in proliferazione sul fondo del pozzetto nel quale è stato incubato lo *scaffold*. Infatti, nella Figura 116A nei riquadri *b* ed *e*, è possibile riscontrare un'ottimale vitalità delle cellule coltivate a contatto indiretto con il poliuretano, con e senza le nanoparticelle di idrossiapatite (in verde), mentre si evidenzia un numero esiguo di cellule morte (riquadro *c* e riquadro *f*). La limitata adesività del materiale è evidente inoltre se si confrontano le immagini con

quelle ottenute da uno *scaffold* di PCL utilizzato come confronto (Figura 116A riquadro g).

Le immagini SEM riportate nella Figura 116B, confermano la scarsa presenza di cellule adese alla superficie degli *scaffolds*. Un'eventuale funzionalizzazione superficiale degli *scaffolds* con un agente adesivo, come ad esempio la sequenza c-RGD, possibile per reazione di scambio tiolo-tiolo sui ponti S-S presenti nel poliuretano, potrebbe essere condotta al fine di incrementare l'adesività del biomateriale.

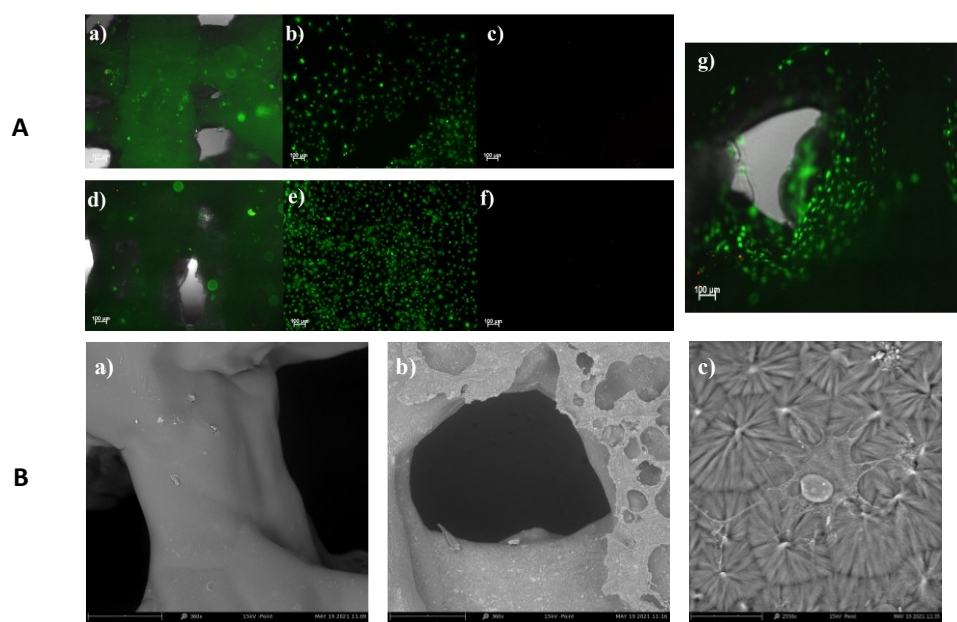


Figura 116. (A) Immagini L&D dopo 3 giorni di coltura delle MC3T3-E1, ottenute tramite sonde fluorescenti e microscopio a fluorescenza. (a) e (d) mostrano la distribuzione cellulare sugli scaffolds di PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp rispettivamente (FITC+Texasred+Brightfield); (b), (e) e (g) mostrano la distribuzione delle cellule vitali nel pozzetto contenente lo scaffold di PolyC₂₄E_{1k}GS, PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp e PCL rispettivamente (FITC); (c) ed (f) mostrano le cellule non vitali nel pozzetto contenente gli scaffolds PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp rispettivamente (Texasred); (B) Immagini SEM degli scaffolds. (a) PolyC₂₄E_{1k}GS, (b) PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp e (c) PCL

La vitalità delle cellule MC3T3-E1 a contatto indiretto con gli *scaffolds 3D printed* di PolyC₂₄E_{1k}GS è stata quantificata tramite saggio MTS, utilizzando come confronto uno *scaffold 3D printed* (con lo stesso *laydown pattern*) di solo PCL. I dati di vitalità indiretta sono stati espressi in termini di assorbanza in funzione del tempo. Il grafico in Figura 117, mostra un valore di assorbanza massima a 7 giorni per le cellule incubate in presenza dello *scaffold* di PolyC₂₄E_{1k}GS, tuttavia mostra una netta riduzione della vitalità dal settimo al quattordicesimo giorno, mentre i valori di assorbanza, quando le

cellule sono incubate in presenza dello *scaffold* PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp, sono pressoché costanti per tutti i tempi saggiati. Come è possibile notare dal grafico, i valori di assorbanza del PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp, ad ogni tempo sono superiori rispetto a quelli del PCL. Questo risultato potrebbe essere dovuto alla maggiore adesività dello *scaffold* di PCL, come dimostrato dalle immagini di *live and dead*. La maggiore adesività del PCL infatti, comporta una maggiore crescita delle cellule sullo *scaffold* con una riduzione delle cellule adese al pozzetto e di conseguenza si ottengono dei valori di assorbanza minori ad ogni tempo.

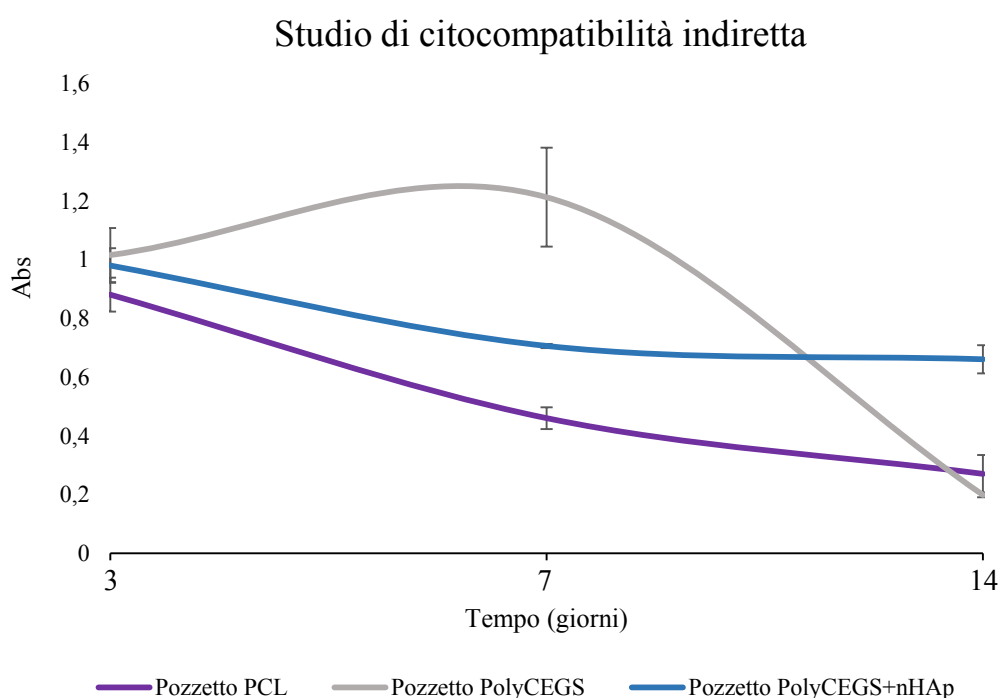


Figura 117. Valori di assorbanza in funzione del tempo delle cellule incubate in presenza di PCL, PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp

3.4.10 Incorporazione del farmaco e studi di rilascio

Sfruttando la tecnica del mortaio, il farmaco è stato incorporato partendo da una soluzione di Doxorubicina·HCl in MeOH, aggiunta goccia a goccia sulla polvere di poliuretano (PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp) (Figura 118). A seguito dell'evaporazione del solvente e dell'essiccamento *over night* in essiccatore, la polvere è stata dispersa in DCM e stampata come descritto precedentemente.

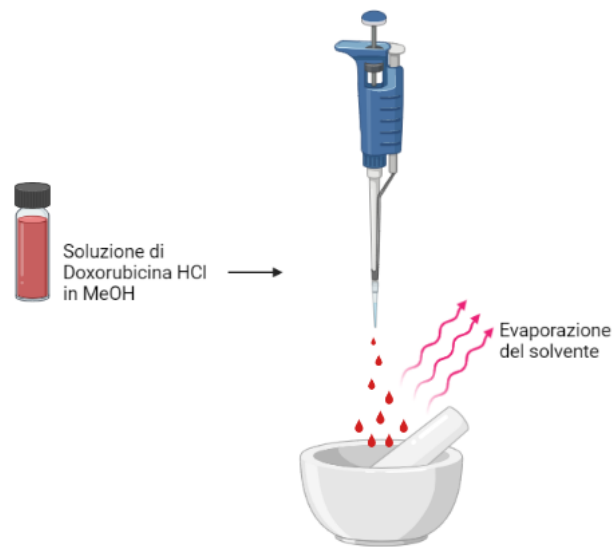


Figura 118. Incorporazione del farmaco tramite la tecnica del mortaio

Gli *scaffolds* di PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp, di un intenso colore arancio (Figura 119), sono stati posti in mezzi differenti per valutare il rilascio del farmaco nel tempo.

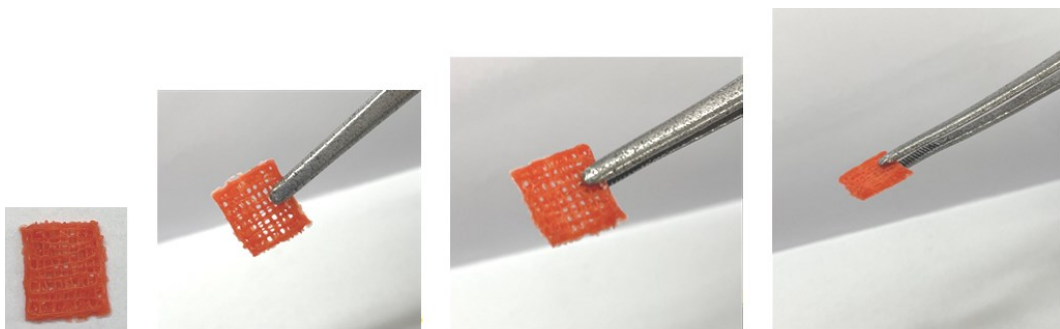


Figura 119. Scaffolds di PolyC₂₄E_{1k}GS e Doxorubicina

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti in quattro mezzi differenti, DPBS a pH 7.4; DPBS a pH 5.5; DPBS pH 7.4 in presenza di GSH (10 mM) e DPBS pH 5.5 in presenza di GSH (10 mM), per valutare la suscettibilità degli *scaffolds* ad ambienti differenti, per diversi tempi: 1 ora, 24 ore, 48 ore 3, 7, 14 e 21 giorni, valutando l'assorbanza della Doxorubicina·HCl a 480 nm tramite spettrometria-UV.

Già, a 24 ore, dal grafico in Figura 120, è possibile notare una differenza significativa nel profilo di rilascio di Doxorubicina tra gli *scaffolds* dopati e non dopati. La presenza di nHAp incrementa significativamente l'entità del rilascio. Anche alla luce della microstruttura dei filamenti stampati, che sono stati osservati tramite SEM e che non mostrano differenze di microporosità tra *scaffolds* dopati e non dopati, è possibile

supporre che l'interazione nHAp con il poliuretano riduca l'affinità della Doxorubicina con il polimero favorendo la diffusione ed il rilascio del farmaco. L'aumentata velocità di rilascio rende più marcate le differenze di rilascio dovute ai differenti mezzi di incubazione. Infatti, mentre nelle matrici non dopate non è possibile evidenziare alcuna differenza statisticamente significativa in termini di rilascio tra i diversi mezzi utilizzati, negli *scaffolds* dopati si riscontra un incremento di rilascio nei mezzi contenenti GSH (sia a pH 7.4 che a pH 5.5) suggerendo una sensibilità all'ambiente riducente e all'abbassamento del pH. Dopo 504 ore (ovvero 21 giorni), ad esempio è rilasciato il 50.6% di Doxorubicina dagli *scaffolds* trattati con il GSH contro il 36% registrato per gli *scaffolds* non incubati in condizioni riducenti. La maggiore quantità di Doxorubicina rilasciata in risposta all'ambiente riducente e debolmente acido, suggerisce che tali sistemi possano essere in grado di rispondere positivamente al microambiente tumorale, liberando una maggiore quantità di farmaco e pertanto favorendo una maggiore attività antitumorale nel tempo.

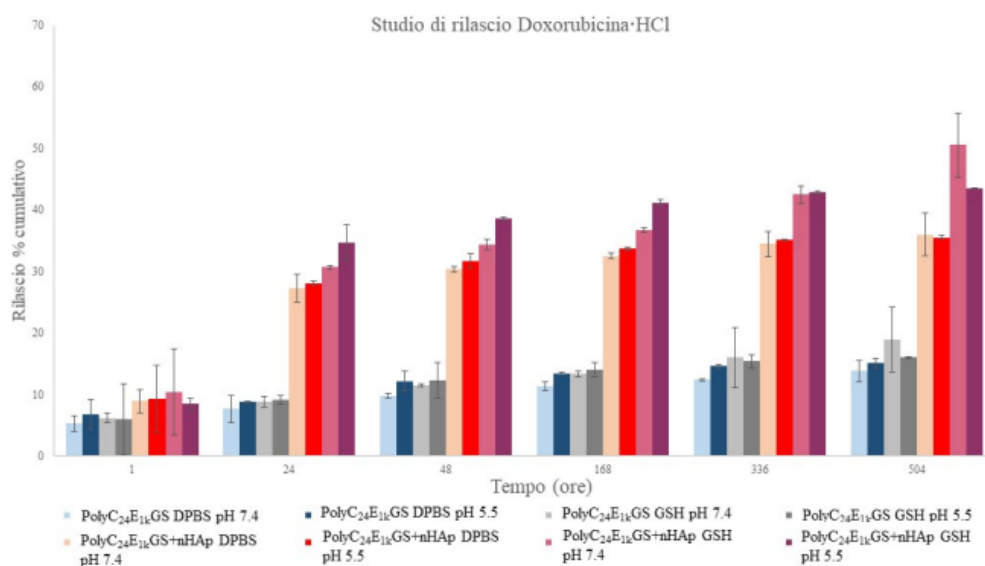


Figura 120. Profilo di rilascio cumulativo di Doxorubicina dagli *scaffolds* di PolyC₂₄E_{1k}GS e PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp in funzione del tempo in differenti mezzi

3.4.11 Studi di citotossicità in vitro e determinazione della concentrazione inibente 50 (IC₅₀)

La IC₅₀ della Doxorubicina, come mostrato in Figura 121, per la linea cellulare HCT-116, è 6 μM. Tra le concentrazioni testate, la più bassa (0.05 μM) risulta essere tossica solo per il 4% delle cellule testate; mentre la concentrazione più alta (50 μM) induce la morte del 92% delle cellule. Dunque, poiché dagli studi di rilascio è stato dimostrato

che la concentrazione di farmaco rilasciata a seguito delle 48 ore è stata 18 μM e 6 μM , rispettivamente per gli *scaffolds* con e senza nHAp, è possibile ipotizzare che la quantità di farmaco rilasciata sia sufficiente ad avere l'effetto citotossico.

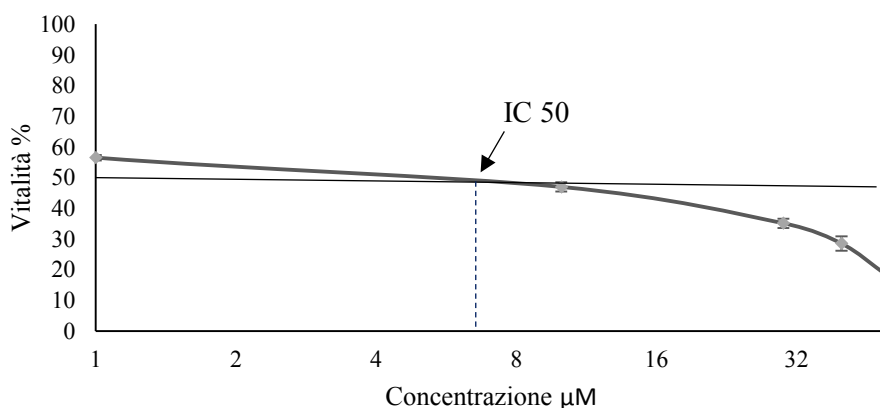


Figura 121. Curva per la valutazione della IC_{50} della Doxorubicina su cellule HCT-116

Dal grafico in Figura 122 è possibile notare come la vitalità cellulare, testata tramite saggio MTS, si riduca in presenza della Doxorubicina, in particolare, dopo 48 ore dall'esposizione, è possibile osservare una riduzione dall'87% al 9% di vitalità per lo *scaffold* in PolyCEGS+nHAp in presenza di farmaco (rispetto allo *scaffold* senza farmaco utilizzato come controllo) e dall'86% al 13.6% per gli *scaffolds* in PolyCEGS rispettivamente in assenza ed in presenza di farmaco, dimostrando così l'efficacia del farmaco stesso. Inoltre, è possibile notare come il farmaco sia ancora attivo sulle cellule nel tempo, in particolare, la vitalità cellulare risulta essere il 25.4% per lo *scaffold* in PolyCEGS+nHAp+Doxo, e il 13.7% per lo *scaffold* in PolyCEGS+Doxo a 96 ore (4 giorni) dall'esposizione; mentre a 168 ore (7 giorni), le cellule vitali risultano essere il 26.7% e il 28.8%, per gli *scaffolds* con e senza nHAp rispettivamente, dimostrando un rilascio del farmaco graduale e duraturo nel tempo, in grado di avere un effetto citotossico continuo.

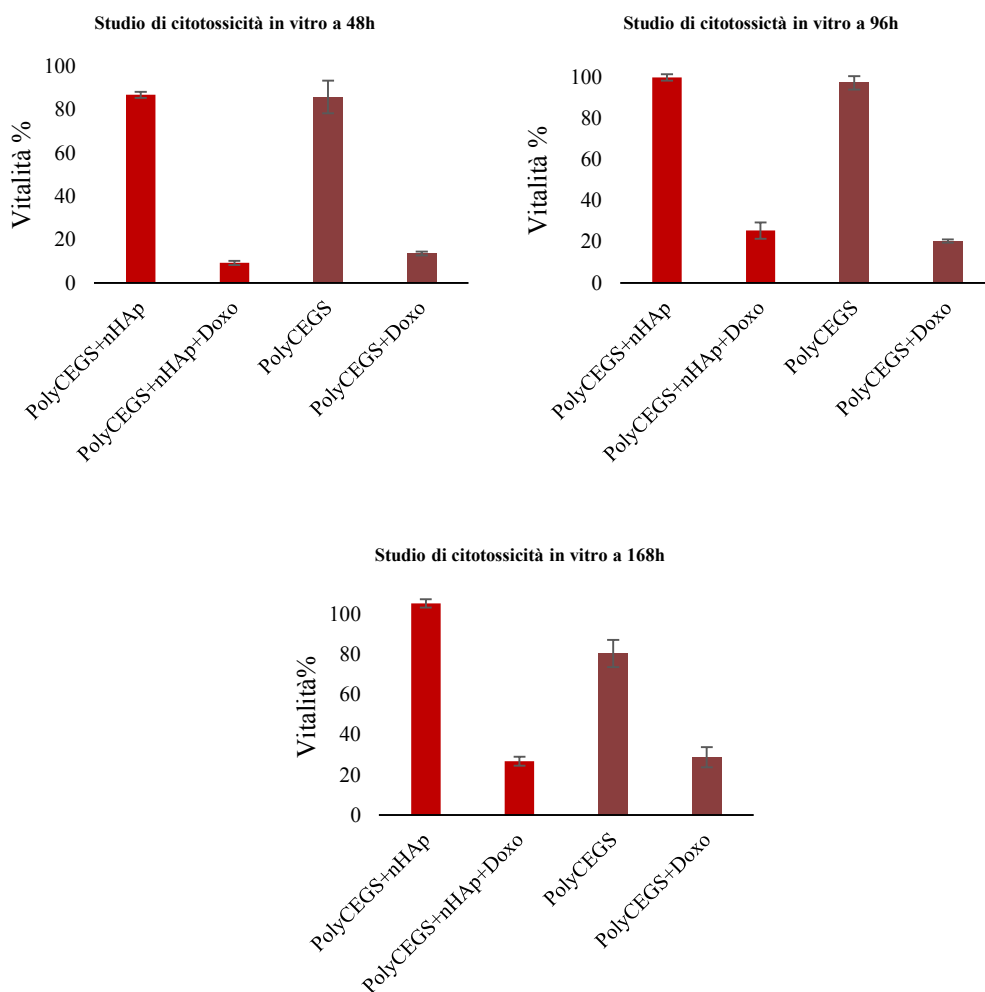


Figura 122. Grafici vitalità cellulare per gli studi di citotossicità in vitro a 48, 96 e 168 ore sulle cellule HCT-116

In Figura 123, sono riportate le immagini in cui è stato messo in risalto il nucleo delle cellule tramite sonda fluorescente Dapi, dimostrando come il farmaco sia riuscito a diffondere all'interno delle cellule fino a raggiungere il nucleo in tutti i tempi testati, confermando il rilascio continuo del farmaco.

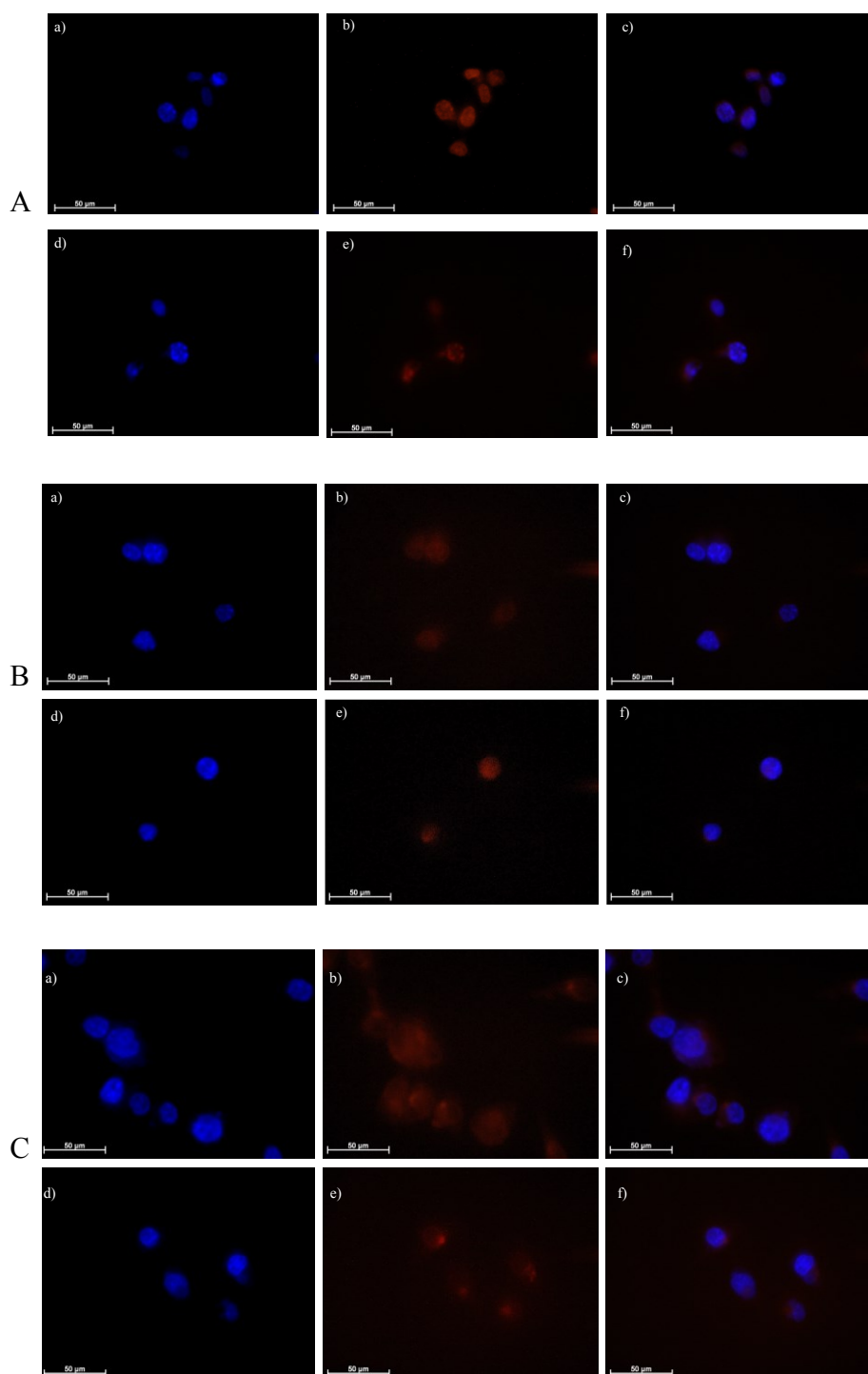


Figura 123. Immagini ottenute tramite microscopio a fluorescenza. A immagini a 48 ore, B a 96 ore, C a 168 ore. a e d (DAPI) rappresentano le immagini a contatto con gli scaffolds di PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp+Doxo e PolyC₂₄E_{1k}GS +Doxo rispettivamente; le immagini b ed e mostrano la presenza del farmaco all'interno della cellula; le immagini c ed f rappresentano il merge

La Figura 124 mostra il confronto tra le cellule della linea cellulare HCT-116 vitali, in cui il nucleo è stato enfatizzato tramite Dapi (Figura 124 a e d), rispetto a quelle trattate

4. Conclusioni

La crescente domanda di biomateriali in grado di soddisfare le esigenze dell'ingegneria dei tessuti ha portato allo sviluppo di nuove strategie in grado di combinare polimeri naturali e sintetici per ottenere nuovi idrogeli, facili da maneggiare a 37 °C e pH fisiologico. A questo scopo, in un primo lavoro di questa tesi di Dottorato, è stato proposto un metodo efficace e riproducibile per la produzione di nuovi copolimeri di gellan gum-graft-poly(D,L-lattide-co-glicolide). Le catene di PLGA hanno permesso di controllare le proprietà fisiche dei derivati. In particolare, modulando il rapporto polimero naturale/sintetico, è possibile monitorare il processo di gelificazione della gomma gellano, il comportamento in presenza di sali esterni, influenzare le proprietà viscoelastiche degli idrogeli e il loro tempo di degradazione.

I nuovi copolimeri sono biocompatibili e possono trovare applicazione in campo biomedico. In particolare, il GGm-PLGAb ha mostrato proprietà reologiche adeguate per la stampa 3D ed è stato utilizzato con successo per generare *scaffolds* 3D. In un contesto generale, per ogni applicazione specifica, le proprietà chimicofisiche di questi nuovi biomateriali possono essere facilmente regolate modificando il rapporto GG/PLGA.

In un secondo lavoro, un derivato amminico della gomma gellano, il GG-EDA, è stato miscelato con un PEG derivato. In particolare, si è scelto di utilizzare un PEG avente una funzione aldeidica, al fine di sfruttare la formazione di un legame imminico tra il suddetto gruppo funzionale e il gruppo NH₂ del GG-EDA, poiché il carattere reversibile di tale legame consente di modificare temporaneamente le caratteristiche chimico-fisiche del GG-EDA e renderlo processabile mediante biostampa 3D.

Il PEG-Aldeide interponendosi tra le eliche del GG-EDA, ne perturba l'*entanglement*, riducendo, così, i valori dei moduli elastico e viscoso e della viscosità delle dispersioni. Nello specifico sono stati prodotti due *inks* a base di GG-EDA-PEG che hanno presentato, entrambi, proprietà reologiche adatte per la biostampa 3D. La successiva incorporazione di cellule, HCT-116 e MC3T3-E1, e gli studi di citocompatibilità hanno evidenziato come il processo di preparazione e miscelazione dei *bioinks* non riduca la vitalità cellulare e che entrambi i polimeri utilizzati siano citocompatibili e possano essere utilizzati per la biostampa.

Concludendo, si può affermare come la caratterizzazione chimicofisica, reologica e biologica, abbia dimostrato una buona processabilità del GG-EDA-PEG mediante

tecniche di biostampa 3D e, pertanto tale biomateriale può essere proposto come potenziale *bioink*. Inoltre è stato studiato l'effetto del tipo cellulare (HCT-116 e MC3T3-E1), della densità cellulare (10K/ml, 1M/ml e 10M/ml) e della reticolazione ionotropica sulle proprietà reologiche del *bioink*. Tutti i risultati suggeriscono di non trascurare la densità cellulare quando si progetta un nuovo bioinchiostro. Anche se l'influenza di questa dipende dal tipo cellulare e altri tipi di cellule possono portare a risultati leggermente diversi, si consiglia di studiare le proprietà reologiche in quanto queste sono strettamente correlate con il successo della stampa e di valutare la vitalità cellulare per selezionare la migliore densità cellulare in grado di garantire la crescita del tessuto.

Inoltre, considerando i numerosi vantaggi che possono offrire gli idrogeli aventi proprietà *self-healing* nella medicina rigenerativa e nella stampa 3D, in questo lavoro di tesi di Dottorato sono stati sviluppati anche degli idrogeli a base di due derivati dell'acido ialuronico. In particolare, sono stati utilizzati HA-Aldeide (HA-Ald) e un nuovo derivato amminico, HA-DETA. Sono stati, quindi, prodotti quattro idrogeli aventi rapporto molare HA-Ald/HA-DETA decrescente, indicati come F1, F2, F3 e F4, al fine di individuare come il rapporto molare dei due derivati influenzasse le proprietà degli idrogeli prodotti.

Gli idrogeli sono stati caratterizzati tramite analisi reologiche, valutando l'efficienza di *crosslinking*, analisi SEM, *swelling* e studi di degradazione per pesata in mezzi a pH 7.4 e pH 5.5. I risultati ottenuti mostrano che il grado di reticolazione, il modulo elastico e l'efficienza di *crosslinking* diminuiscono al diminuire del rapporto molare CHO/NH₂. Gli idrogeli ottenuti sono fortemente influenzati dal pH con valori di *swelling* maggiori e valori dei moduli elastici inferiori a pH 5.5 rispetto ai valori ottenuti a pH 7.4.

Tramite analisi di *flow sweep* è stato studiato il comportamento pseudoplastico dei diversi idrogeli, mentre le proprietà *self-healing* sono state confermate sia macroscopicamente che tramite analisi di *recovery time*.

Tutti gli idrogeli sono risultati citocompatibili, come confermato dal saggio MTS e *Live&Dead* eseguiti a 24 ore, 48 ore e 7 giorni.

Inoltre, sono state effettuate prove preliminari al fine di creare uno *scaffold* in grado di consentire un potenziale rilascio controllato di nanoparticelle di argento (AgNPs) per una futura applicazione di tali idrogeli per il *drug delivery*.

Infine, in questa tesi di Dottorato, con lo scopo di produrre nuovi biomateriali di supporto, sono stati sintetizzati quattro derivati poliuretanicici con caratteristiche chimicofisiche differenti, caratterizzati dalla presenza di porzioni *soft* costituite dai copolimeri *tri-block* PCL-PEG-PCL e porzioni *hard* costituite da GSSG-OMe₄ e BDI. Tra i derivati poliuretanicici sintetizzati, il PolyC₂₄E_{1k}GS, è stato selezionato per la produzione di sistemi impiantabili per la progettazione di un sistema di *drug delivery* per il rilascio loco regionale di Doxorubicina nel trattamento dei tumori del tessuto osseo, e contemporaneamente in grado di favorire la rigenerazione ossea, grazie alla presenza di idrossiapatite come potenziale agente osteoinduttivo.

La tecnica del *solvent casting 3D printing* ha permesso la produzione di *scaffolds* che fungano da supporto per il rilascio di farmaci che, se processati con la tecnica FDM, si degraderebbero.

Gli studi di degradazione idrolitica hanno dimostrato la stabilità e la resistenza delle matrici stampate nel tempo e nei diversi mezzi saggiati, requisito fondamentale per sistemi a rilascio prolungato. Gli studi di citocompatibilità sugli osteoblasti, hanno dimostrato la non tossicità dei sistemi, associata però ad una scarsa adesività.

Il rilascio del farmaco, è stato saggiato in diversi mezzi per valutare l'influenza del mezzo riducente e del pH. I dati riportati suggeriscono che lo *scaffold 3D printed* con le nanoparticelle di idrossiapatite risponde positivamente all'ambiente riducente ed acido che è stato mimato *in vitro*, favorendo un migliore rilascio della Doxorubicina caricata.

Infine, sono stati eseguiti studi di citotossicità *in vitro*, che hanno permesso di apprezzare la riduzione della vitalità cellulare associata alla diffusione del farmaco all'interno delle cellule a diversi tempi, confermando il rilascio prolungato della Doxorubicina ed il suo prolungato effetto citotossico.

In questo caso la stampa 3D è utile nella personalizzazione della terapia così come la forma dello *scaffold* permette un rilascio del farmaco variabile e correlato non solo alla *drug loading* ma anche alla superficie esposta.

5. Parte sperimentale

5.1 Un nuovo *bioink* a base di un derivato della gomma gellano funzionalizzato con PLGA: sintesi, caratterizzazione e valutazione della stampabilità in 3D

5.1.1 Materiali

Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia): gellan gum (Gelrite®), idrossido di tetrabuttilammonio (TBA-OH), bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC), cloruro di calcio anidro (CaCl₂), diclorometano (DCM), etanolo (EtOH), acetone, dimetilsulfossido anidro (DMSO_a), dimetilformammide (DMF), Dowex® 50WX8 forma idrogenata, idrossido di sodio (NaOH), etilendiammina (EDA), arancio di acridina (AO), etidio omodimero-1 (EthD-1) esametildisilazano e *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS). Il *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) è stato acquistato da Promega (Italia).

L'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) 5002A PURASORB® (rapporto lattide/glicolide 50:50, viscosità intrinseca media di 0.22 dl/g) è stato acquistato da Corbion (Paesi Bassi).

5.1.2 Metodi

La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è stata eseguita utilizzando un sistema dotato di pompa, un rivelatore di indice di rifrazione 2410, tutti acquistati da Waters (TA Instruments - Waters S.p.A., Italia).

Le analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) sono state effettuate utilizzando uno strumento Bruker Alpha con un range di numero d'onda da 400 a 4000 cm⁻¹.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare del protone (¹H-NMR) sono stati registrati utilizzando uno strumento Bruker AC-300 che opera a 300.12 MHz.

Le prove reologiche sono state effettuate utilizzando un DHR-2 TA Instrument *oscillatory rheometer* dotato di una geometria a piatti piani paralleli di diametro pari a 8 mm con scanalature radiali e di una piastra Peltier auto-riscaldante (TA Instruments - Waters S.p.A.).

Le colture cellulari sono state allestite utilizzando un incubatore Eppendorf New Brunswick S41i.

Il valore di assorbanza per il saggio MTS è stato misurato a 492 nm mediante il *microplate reader* Thermo (Thermo, UK). Le misurazioni UV sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Eppendorf AF2200.

Le immagini in fluorescenza sono state acquisite con un microscopio AxioVert200 (Zeiss).

Le immagini di microscopia elettronica a scansione (SEM) sono state acquisite con uno strumento Phenom XL, Alfatest.

Per la biostampa 3D è stata utilizzata la stampante a microestrusione BioX (CELLINK, Svezia) mostrata in Figura 125.



Figura 125. Biostampante BIO X (CELLINK, 2020)

5.1.3 Degradazione della gomma gellano e produzione di gomma gellano (peso molecolare medio) sale di tetrabuttilammonio

La degradazione della gomma gellano, il cui peso molecolare iniziale era pari a 1000 kDa, è stata effettuata in condizioni alcaline (Agnello, et al., 2018; Nitta, et al., 2010). In particolare, 5 g di gomma gellano di partenza (Gelrite®) sono stati sospesi in un litro di soluzione NaOH 0.1 M (pH 13). Il lotto è stato omogeneizzato per 10 minuti con un agitatore a lama a 200 rpm ed è stato mantenuto sotto agitazione per 24 ore a 50°C. Successivamente, il lotto è stato neutralizzato con HCl 1 N. La soluzione finale è stata dializzata (*cut-off* 25 kDa) contro acqua distillata per 4 giorni ed infine liofilizzata (*freeze-dried*). E' stato così ottenuta la GGm (dove con m si indica peso molecolare medio), un derivato avente peso molecolare inferiore rispetto a quello della

gomma gellano di partenza. La resina a scambio di ioni idrogeno Dowex® 50W-X8, attivata in via preliminare con un grande eccesso di HCl 1 N, è stata poi lavata più volte con acqua e utilizzata per ottenere la GGm nella sua forma acida. Infine, la GGm sale di tetrabutylammonio (GGm-TBA) è stata ottenuta aggiungendo, fino alla neutralizzazione, idrossido di tetrabutylammonio (TBA-OH) alla forma acida di GGm. La soluzione di GGm-TBA è stata liofilizzata e utilizzata per la successiva modifica chimica (Pawar & Edgar, 2011).

5.1.4 Sintesi e caratterizzazione del derivato poli(lattide-co-glicolide)-etilendiammina (PLGA-EDA)

Il PLGA-EDA è stato sintetizzato a partire da 1 g di PLGA che è stato disciolto in 90 ml di diclorometano (concentrazione finale dell'1% p/v), immerso in un bagno d'acqua a 40°C ed è stato attivato mediante l'aggiunta di 10 ml di DCM contenenti 21.48 mg di 4-NPBC in modo da ottenere un rapporto molare, X, pari a 1.2.

Dopo 4 ore dall'attivazione, la temperatura è stata portata a 60°C, con trasferimento su una piastra ad olio, ed è stato aggiunto un quantitativo di etilendiammina (EDA) tale da ottenere un rapporto molare, Y, pari a 5. Dopo 3 ore, il PLGA-EDA è stato precipitato in un eccesso di etanolo, successivamente è stato lavato più volte con etanolo e, infine, essiccato per rimuovere il solvente di lavaggio.

Il grado di funzionalizzazione dei gruppi EDA legati al PLGA è stato determinato mediante analisi ¹H-NMR (in CDCl₃) del PLGA-EDA confrontando il picco a δ 2.4, attribuibile ai gruppi metilenici dell'etilendiammina (-CH₂-(CH₂)-NH₂), con il picco a δ 1.9, attribuibile al gruppo metilico del PLGA (-CH₃ della porzione del PLA del PLGA).

5.1.5 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri GGm-graft-PLGA-EDA

I copolimeri GGm-graft-PLGA-EDA (siglati d'ora in avanti GGm-PLGA) sono stati preparati sciogliendo 1 g di GGm-TBA in 80 ml di DMSO_a per ottenere una concentrazione finale dell'1% p/v.

La GGm-TBA è stata posta in un bagno d'acqua a 40°C e attivata aggiungendo 2 ml di DMSO_a contenenti 34.3, 51.5 o 85.8 mg di 4-NPBC allo scopo di ottenere i copolimeri GGm-PLGA_a, GGm-PLGA_b e GGm-PLGA_c con un rapporto molare, X', tra 4-NPBC e unità ripetitive di GGm, pari, rispettivamente, a 0.1, 0.15 e 0.25. Dopo 4 ore

dall'attivazione, la temperatura è stata aumentata a 60°C e un quantitativo adeguato di PLGA-EDA è stato aggiunto in 18 ml di DMSO_a per ottenere un rapporto molare, Y', tra PLGA-EDA e 4-NPBC, pari a 1.5. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 60°C per 24 ore. Successivamente, è stato aggiunto 1 ml di soluzione satura di NaCl, mantenendo la soluzione sotto agitazione per 30 minuti.

I copolimeri GGm-PLGA, una volta ottenuti, sono stati recuperati dopo precipitazione in eccesso di etanolo e successivi lavaggi, effettuati più volte, con una miscela acetone/acqua (9:1 v/v) e, infine, con solo acetone.

I campioni sono stati caratterizzati mediante analisi ATR-FTIR e ¹H-NMR.

Gli spettri ATR-FTIR dei tre copolimeri hanno mostrato nuovi picchi a ~1750 cm⁻¹, ~1705 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹ e a 1365 cm⁻¹.

Gli spettri ¹H-NMR dei copolimeri GGm-PLGA (campioni a, b e c dispersi in D₂O più 50 µl di NaOD aggiunti prima di eseguire l'analisi) hanno mostrato i picchi principali a: δ 1.18 e 1.16 ed il picco a δ 3.79.

I valori del peso molecolare medio ponderale (M_w) e dell'indice di polidispersità (PDI) di GGm e dei copolimeri GGm-PLGA sono stati determinati mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC). I polimeri, isolati come sali di tetrabuttilammonio, sono stati dispersi (3.75% p/v) in dimetilformammide (DMF) con LiBr, 0.05 M. L'eluizione è stata eseguita su Phenogel 5 µm 103 Å LC Colonna 300 x 7.8 mm da Phenomenex a 40°C, utilizzando come eluente una soluzione di LiBr 0.05 M in DMF con un flusso di 0.8 ml/min. È stata utilizzata una curva di taratura con standard di polistirene.

5.1.6 Studi reologici

Per eseguire gli studi reologici, gli idrogeli sono stati prodotti ponendo le dispersioni acquose (5% p/v), di GGm o dei copolimeri GGm-PLGA, all'interno dei pozzetti di una piastra 24-well NuncTM. In particolare, le dispersioni acquose sono state riscaldate a 90°C per 1 ora e poi aggiunte nei pozzetti, gli idrogeli così formati sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 24 ore in modo da garantire la completa gelificazione.

Sono stati eseguiti esperimenti di *flow ramp*, condotti a 37°C, per i campioni non reticolati, per valutare la dipendenza della viscosità quando la velocità di taglio aumenta, al fine di ottenere informazioni utili riguardo la lavorazione e le prestazioni del materiale analizzato. La dipendenza della viscosità, quando la velocità di taglio

aumenta, nello specifico, è stata valutata sottoponendo gli idrogeli per 60 secondi ad uno *shear rate* crescente da 0.1 s^{-1} fino a 1000 s^{-1} .

E' stata eseguita un'ulteriore caratterizzazione, con prove di *frequency sweep*, sui campioni reticolati per valutare le prestazioni meccaniche e l'effetto del *crosslinking* ionotropico. In particolare, i campioni sono stati preparati immergendo le dispersioni acquose per 1 ora in una soluzione di CaCl_2 (0.102 M). Per questi campioni la regione di viscoelasticità lineare è stata valutata preliminarmente con esperimenti di *strain sweep* applicando una frequenza costante di 0.1 Hz. In particolare, la linearità è stata trovata nell'intervallo di deformazione 0.6-1% per la GGm e 0.8-8% per i copolimeri GGm-PLGA.

Le prove di *frequency sweep* sono state eseguite a temperatura costante (37°C) in un intervallo di frequenze di oscillazione compreso tra 0.01 e 100 Hz, applicando una deformazione (*strain*) costante del 10% per le dispersioni acquose, cioè per i campioni non reticolati, e dell'1% per i campioni reticolati in CaCl_2 0.102 M.

Il *gap* di misura è stato impostato a $300 \mu\text{m}$ per tutte le analisi effettuate e il campione in eccesso è stato accuratamente rimosso prima dell'inizio di ogni esperimento. Tutte le prove sono state effettuate in triplicato utilizzando la geometria a piatti piani paralleli con scanalature radiali.

5.1.7 Preparazione dei films

I *films* di GGm e dei copolimeri di GGm-PLGA (campioni a, b e c) sono stati realizzati disperdendo ciascun polimero in acqua bidistillata a 90°C . Dopo 1 ora, $200 \mu\text{l}$ della dispersione di ciascun prodotto (5% p/v) sono stati inseriti nei pozzetti di una piastra di politetrafluoroetilene e lasciati raffreddare e seccare a temperatura ambiente, infine sono stati liofilizzati. I *films* reticolati sono stati ottenuti aggiungendo una soluzione di CaCl_2 0.102 M per 1 ora ai campioni liofilizzati. Successivamente, la soluzione salina è stata rimossa, i *films* sono stati lavati rapidamente con acqua e nuovamente liofilizzati.

5.1.8 Studi di swelling

Per studiare il rigonfiamento (*swelling*) dinamico, i *films* di GGm e dei copolimeri GGm-PLGA (campioni a, b e c) reticolati e non reticolati (ottenuti come descritto sopra), sono stati immersi in una soluzione di DPBS a 37°C , sotto leggera agitazione.

A tempi stabiliti, in particolare dopo 1, 2, 8, 12 e 16 giorni, ogni campione è stato trasferito su una piastra di Petri e, dopo aver rimosso il liquido in eccesso, è stato pesato (peso finale).

Il rapporto in peso di *swelling* (q) è stato calcolato con la seguente equazione:

$$q = \frac{W_s}{W_d}$$

dove W_s e W_d sono, rispettivamente, il peso del campione rigonfio e il peso del campione secco. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

5.1.9 Studi di degradazione

Per studiare il profilo di degradazione, i *films* di GGm e dei copolimeri GGm-PLGA (campioni a, b e c) reticolati e non reticolati, ottenuti come descritto in precedenza, sono stati immersi in una soluzione di DPBS a 37°C, sotto leggera agitazione. A diversi tempi (1, 2, 8, 12 e 16 giorni), i campioni sono stati rapidamente lavati in acqua bidistillata per rimuovere i sali di DPBS. I *films* sono stati poi liofilizzati ed infine pesati (peso finale).

La degradazione dei campioni è stata espressa come percentuale di peso recuperato (%), calcolata con la seguente equazione:

$$W_r \% = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

in cui W_f è il peso del campione recuperato (peso finale) ad ogni tempo stabilito, e W_i rappresenta il peso iniziale. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

5.1.10 Studi di citocompatibilità in vitro

Per gli studi biologici sono stati impiegati fibroblasti murini 3T3 coltivati nel *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM) arricchito con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), l'1% v/v di soluzione di penicillina-streptomicina, l'1% v/v di soluzione di glutammina e lo 0.1% v/v di soluzione di amfotericina B. Le cellule sono state mantenute all'interno di una fiasca contenente 10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Dopo tripsinizzazione, le cellule sono state contate e risospese in DMEM. Nello specifico,

per i test di citocompatibilità, le cellule sono state piastrate con una densità pari a 1×10^4 cellule per pozzetto su una piastra a 96 pozzetti.

Dopo 24 ore, allo strato cellulare presente nei pozzetti, è stata aggiunta una dispersione polimerica (1 mg/ml) di GGm o dei copolimeri GGm-PLGA e, successivamente, tramite saggio colorimetrico MTS (eseguito seguendo il protocollo riportato dal produttore) è stata valutata la vitalità delle cellule. In particolare, dopo 24 e 48 ore di incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con 100 μ l di mezzo fresco, e 20 μ l di una soluzione di MTS sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C. L'assorbanza a 492 nm è stata registrata mediante un lettore *microplate reader* ad assorbanza UV-vis e la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di vitalità rispetto alle cellule incubate in presenza del solo mezzo di coltura, che sono state utilizzate come controllo negativo.

Inoltre, dopo 24 o 48 ore di incubazione, le cellule sono state trattate con arancio di acridina (AO) ed etidio omodimero (EthD-1), in modo da discriminare le cellule vive da quelle morte. Per la visualizzazione è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza. Per l'esecuzione degli studi di citocompatibilità, i campioni sono stati sterilizzati, in forma di polvere, mediante UV a 254 nm, per 20 minuti, utilizzando una lampada UV da 125 W. Successivamente, è stata aggiunta acqua sterile in modo da ottenere le dispersioni polimeriche. Queste sono state mantenute a 90°C per 1 ora e in seguito sono state poste in un bagno d'acqua a 40°C fino al momento in cui sono state aggiunte ad ogni pozzetto contenente le cellule.

5.1.11 Yield stress e Recovery test

Per studiare le prestazioni reologiche e la stampabilità è stato selezionato il copolimero GGm-PLGAb (5% p/v) disperso in varie miscele acqua/DPBS (100:0, 60:40, 50:50, 25:75, 0:100). In particolare, è stato misurato lo *yield stress* e il recupero del modulo di conservazione (*storage modulus*) del campione privo di cellule. Lo *yield stress* è stato analizzato applicando uno *shear stress*, da 0.1 a 2000Pa (durata dell'analisi: 5 min; temperatura: 37 ° C).

Il *recovery test* del materiale è stato studiato applicando un valore di *strain %* del 5% per 200 s, questa fase è stata seguita da una deformazione alta corrispondente al 500% per 200 s ed infine nuovamente del 5% per 500 s.

5.1.12 Preparazione del bioink, incapsulazione cellulare e prove di stampa 3D

Per la preparazione del *bioink* è stato utilizzato il copolimero GGm-PLGAb. In particolare, questo è stato sterilizzato in forma di polvere mediante irradiazione UV a 254 nm, per 20 minuti, con una lampada UV da 125 W. Successivamente, è stato disperso in diverse miscele acqua/DPBS (100:0, 60:40, 50:50, 25:75, 0:100) e mantenuto a 90°C per 1 ora.

Per valutare la stampabilità, ciascuna dispersione polimerica, prima del raffreddamento, è stata caricata all'interno di una siringa. Le prove preliminari di stampa, in particolare, sono state eseguite al fine di identificare i parametri di stampa ottimali a 37°C. Nello specifico, i migliori parametri ottenuti sono stati: miscela acqua/DPBS 60:40; pressione dell'aria 50 kPa, velocità di stampa 2.5 mm/s, ago 27GG.

Pertanto, è stata selezionata la miscela acqua/DPBS 60:40 per la preparazione della dispersione del copolimero GGm-PLGAb (5% p/v) al quale sono state miscelate le cellule 3T3 fibroblasti murini o condrociti primari bovini (1×10^6 cells/ml) e la dispersione è stata caricata in una siringa e mantenuta a 37 °C. La stampante utilizzata (BioX CELLINK) è stata precedentemente sterilizzata con etanolo al 70% e trasferita sotto una cappa a flusso laminare. La forma selezionata per la stampa è stata una griglia di dimensioni $10 \times 10 \times 3$ mm e 25% di riempimento. I costrutti sono stati stampati all'interno di una piastra a 6 pozzetti. Dopo la stampa, i costrutti cellulari stampati sono stati incubati nel terreno di coltura per 1 e 7 giorni in condizioni standard (37 °C, 5% CO₂ e 95% umidità relativa), con cambiamenti regolari del mezzo. Lo stesso esperimento è stato eseguito su campioni reticolati. Questi sono stati ottenuti incubandoli con una soluzione 0.102 M di CaCl₂ per 10 minuti e lavati due volte con terreno di coltura. Tutti i campioni, sia prima che dopo la stampa, sono stati trattati con arancio di acridina (AO) ed etidio omodimero-1 (Ethd-1), che ha permesso di distinguere tra cellule vive e morte e di rilevare stadi di apoptosi cellulare, utilizzando un microscopio a fluorescenza. Dopo 15 giorni di coltura, i campioni incapsulati con condrociti, sia stampati che non stampati, sono stati lavati con DPBS e fissati con formaldeide al 4% v/v. I campioni sono stati lavati con acqua e successivamente disidratati con graduali concentrazioni di etanolo (30%, 50%, 70%, 90% v/v e etanolo puro) e infine, con esametidisilazano (HMDS). I campioni essiccati sono stati analizzati attraverso microscopio elettronico a scansione SEM per l'osservazione cellulare.

5.1.13 Analisi statistica

Tutti i risultati sono riportati come media \pm deviazione standard e, quando applicabile, l'analisi statistica per la significatività è stata eseguita attraverso il Student's t-test, utilizzando la funzione statistica t-test di Microsoft Excel, assumendo una varianza non omogenea a due campioni e una distribuzione a due code; i valori con $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

5.2 Produzione, caratterizzazione chimico-fisica, reologica e biologica di un *bioink* a base di un derivato amminico della gomma gellano

5.2.1 Materiali

Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia): gomma gellano (Gelrite®), idrossido di sodio (NaOH), Dowex® 50WX8 forma idrogenata, idrossido di tetrabuttilammonio (TBA-OH), dimetilsolfossido anidro (DMSO_a), bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NPBC), etilendiammina (EDA), acetone, O-[2-(6-Oxocaproilamino)etil]-O'-metilpolietilene glicole 2'000, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS), *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM), Live/Dead Cell Double Staining Kit, D₂O.

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) è stato acquistato da Promega (Italia)

È stato acquistato dalla ditta Fluka: acido cloridrico (HCl).

Sono state acquistate dalla ditta Euroclone: HCT-116 (linea cellulare del carcinoma al colon) e MC3T3-E1 (cellule staminali preosteoblastiche murine).

5.2.2 Metodi

Le analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) sono state effettuate utilizzando uno strumento Bruker Alpha con un range di numero d'onda da 400 a 4000 cm⁻¹.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare del protone (¹H-NMR) sono stati registrati utilizzando uno strumento Bruker AC-300 che opera a 300.12 MHz.

Le analisi reologiche sono state eseguite mediante il DHR-2 TA Instruments oscillatory rheometer, usando una geometria a piatti piani paralleli, con 8 mm di diametro e scanalature radiali e di una piastra Peltier auto-riscaldante (TA Instruments - Waters S.p.A.).

Le colture cellulari sono state allestite utilizzando un incubatore Eppendorf New Brunswick S41i.

Il valore di assorbanza per il saggio MTS è stato misurato a 492 nm mediante il microplate reader Thermo (Thermo, UK). Le misurazioni UV sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Eppendorf AF2200.

Le immagini in fluorescenza sono state acquisite con un microscopio AxioVert200 (Zeiss).

Per la biostampa 3D è stata utilizzata una stampante Zmorph collegata ad un sistema di controllo della pressione Elveflow.

5.2.3 Sintesi del derivato della gomma gellano, GG-EDA

La gomma gellano è stata, anzitutto, degradata al fine di ottenerne un polimero a più basso peso molecolare e il suo relativo sale di tetrabutylammonio (chiamato in sigla GG-TBA) secondo una procedura messa a punto nel Laboratorio di Polimeri Biocompatibili dell'Università degli Studi di Palermo (Fiorica, et al., 2020) come già precedentemente descritto.

La sintesi del derivato gomma gellano-(2-aminoetil)-carbammato (di seguito indicato come GG-EDA) è stata effettuata nelle seguenti condizioni: 500 mg di GG-TBA sono stati dispersi in 45 ml di DMSO anidro, per ottenere una concentrazione finale dell'1% p/v, e la dispersione è stata posta sotto agitazione a 40 °C per 30 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti goccia a goccia 85.7 mg di 4-NPBC, precedentemente sciolti in 5 ml di DMSO anidro, e la reazione è stata condotta a 40 °C per 4 ore. Il rapporto molare (X) tra le moli di 4-NPBC e le moli di unità ripetitive di GG-TBA, è stato posto pari a 0,5. Dopo 4 ore, 188 µl di EDA sono stati aggiunti goccia a goccia e sotto agitazione alla dispersione e la reazione è stata condotta per altre 3 ore a 40 °C. Il rapporto molare (Y) tra EDA e 4-NPBC è stato posto pari a 10. La reazione è stata interrotta aggiungendo 500 µl di soluzione satura di NaCl. Dopo 30 minuti dall'aggiunta della soluzione salina, il prodotto è stato isolato mediante precipitazione in acetone e, quindi, purificato tramite 4 lavaggi con una miscela acetone/acqua (8: 2 v/v) e due lavaggi con acetone. Il derivato GG-EDA è stato, infine, recuperato mediante essiccazione sottovuoto a temperatura ambiente con una resa del 65% rispetto al peso iniziale di GG-TBA e, successivamente caratterizzato mediante analisi ¹H-NMR. Al fine di essere utilizzato per la preparazione del *bioink*, il GG-EDA ottenuto è stato disperso a caldo (90°C) in acqua bidistillata ad una concentrazione pari all'1% p/v e il pH della dispersione ottenuta è stato portato a pH 6.5 mediante HCl 1N. Il prodotto è stato isolato per *freeze-drying*.

5.2.4 Preparazione e caratterizzazione della dispersione per stampa (ink)

La dispersione per la stampa (*ink*) è stata preparata disperdendo a caldo il GG-EDA in acqua bidistillata al 3% p/v e aggiungendo una soluzione di O-[2-(6-Oxocaproilamino)

etil]-O'-metilpolietilene glicole 2'000 (di seguito indicato come PEG-aldeide) al 3% p/v sempre in acqua bidistillata al fine di ottenere una concentrazione finale di GG-EDA-PEG al 3% p/v.

In particolare, sono stati utilizzati due diversi rapporti molari, X' e X'', tra le moli di PEG-aldeide e le moli di EDA presente nel polimero GG-EDA, rispettivamente pari a 0.2 e 0.4. Gli *inks* ottenuti sono stati indicati come A e B.

In dettaglio, 500 mg di GG-EDA sono stati dispersi in 16.67 ml di acqua bidistillata a 90 °C, quindi sono stati aggiunti 3.93 ml di soluzione acquosa contenenti 118 mg di PEG-aldeide al fine di ottenere l'*ink* A e 7.86 ml di soluzione acquosa contenenti 236 mg di PEG-aldeide per ottenere l'*ink* B. I campioni sono stati caratterizzati mediante analisi ATR-FTIR e ¹H-NMR.

5.2.5 Caratterizzazione reologica degli inks

Per eseguire gli studi reologici, sono stati prodotti degli idrogeli ponendo 200 µl di ciascuna delle dispersioni acquose al 3% p/v dei due polimeri A e B preparate come indicato nel paragrafo precedente all'interno dei pozzetti di una piastra 48-*well cell culture*. Gli idrogeli così formati a temperatura ambiente sono stati utilizzati per le analisi reologiche di seguito indicate.

Sono stati effettuati studi di *oscillation amplitude* applicando *strain %* (deformazioni) crescenti tra 0.1% e 1000.0%, in condizioni di temperatura e frequenza angolare costanti, rispettivamente, pari 25 °C e 1.0 rad/s. In tal modo sono stati determinati la regione di viscoelasticità lineare (a bassi valori di *strain %*) e quella in cui si verifica una inversione dei moduli elastico e viscoso.

Analisi di *frequency sweep* sono state eseguite a temperatura costante (25 °C) in un intervallo di frequenze di oscillazione compreso tra 0.06283 e 62.83 rad/s (corrispondente all'intervallo 0,010-10 Hz), applicando uno *strain %* costante dell'1.0%.

Inoltre, sono stati eseguiti esperimenti di *flow sweep*, condotti a 25°C, per valutare la variazione della viscosità all'aumentare della velocità di taglio. La dipendenza della viscosità, quando la velocità di taglio aumenta, nello specifico, è stata valutata sottoponendo gli idrogeli ad uno *shear rate* (velocità di applicazione dello sforzo di taglio) crescente da 0.01 s⁻¹ fino a 100.0 s⁻¹.

Sono stati effettuati, anche, test di *temperature sweep*, al fine di valutare la dipendenza dei moduli elastico e viscoso dalla temperatura, essendo i polimeri utilizzati

termosensibili. L'analisi è stata condotta nell'intervallo di temperatura tra 60 °C e 5°C, con una *ramp rate* di 2 °C/min, applicando uno *strain %* dell'1% e una frequenza angolare pari a 1.0 rad/s.

Infine, sono stati eseguiti test di *recovery* applicando un valore di *strain %* dell'1% per 100 s, seguito da uno più elevato corrispondente al 500% per 100 s, quindi nuovamente fino ad un totale di 7 *steps*. L'analisi è stata condotta a 25 °C e ad una frequenza angolare di 1 rad/s.

Il *gap* di misura è stato impostato a 300 µm per tutte le analisi effettuate e il campione in eccesso è stato accuratamente rimosso prima dell'inizio di ogni esperimento. Tutte le prove sono state effettuate in duplicato utilizzando la geometria a piatti piani paralleli con scanalature radiali.

5.2.6 Studi di degradazione

Gli studi di degradazione sono stati condotti su *scaffold* porosi ottenuti tramite *freeze-drying* a partire dagli *inks* A e B al 3% p/v preparati come descritto precedentemente. Nello specifico, 500 µl di ciascun *ink* sono stati iniettati nei pozzetti di una piastra 48-*well cell culture*, lasciati raffreddare a temperatura ambiente e, quindi, sottoposti a *freeze-drying*.

Per studiare il profilo di degradazione, gli *scaffold* sono stati immersi, dopo averne determinato la massa iniziale, in una soluzione di DPBS a 37°C, sotto leggera agitazione, all'interno dei pozzetti di una piastra 24-*well cell culture*. A diversi tempi (7, 14, 21 giorni), i campioni sono stati lavati ripetutamente in acqua bidistillata per rimuovere i sali di DPBS, quindi, sono stati sottoposti a *freeze-drying* e nuovamente pesati.

La degradazione dei campioni è stata espressa come percentuale di peso recuperato ($W_r\%$), calcolata con la seguente equazione:

$$W_r\% = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

in cui W_f è il peso del campione recuperato (peso finale) ad ogni tempo stabilito, e W_i rappresenta il peso iniziale. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

5.2.7 Prove di stampa

Per valutare la stampabilità e, al contempo, determinare i parametri di stampa ottimali per ciascun *ink* (privo di cellule), sono state effettuate prove di stampa mediante una stampante Zmorph collegata ad un sistema di controllo della pressione *Elveflow*.

Gli *inks* di entrambi i polimeri GG-EDA-PEG A e B per le suddette prove sono stati preparati come descritto nel paragrafo 5.2.4, aggiungendo, però, alle dispersioni di entrambi i polimeri, blu di timolo (0.1% p/v) per rendere maggiormente visibile le strutture stampate e studiarne la conformità al modello digitale prodotto.

La forma selezionata per la stampa è stata una struttura a nido d'ape, dal diametro di 2 cm, prodotta con il *software* Voxelizer.

Infine, la valutazione della conformità al modello digitale è stata effettuata calcolando l'area delle maglie esagonali presenti nelle strutture stampate aventi migliore risoluzione e rapportandola a quelle del modello digitale mediante la seguente formula

$$F_{ma} = \frac{A_e}{A_t} \times 100$$

dove F_{ma} (*fidelity on mesh area*) è il parametro indice della fedeltà dell'area della maglia, A_e rappresenta l'area della maglia ottenuta sperimentalmente mentre A_t rappresenta l'area della maglia teorica, derivante dal modello digitale.

Le suddette misurazioni sono state effettuate con il *software* Imagej.

5.2.8 Preparazione e caratterizzazione dei bioinks

Per la preparazione dei *bioinks* dei due polimeri A e B si è proceduto nel seguente modo: 500 mg di GG-EDA sono stati dispersi in 14.30 ml di acqua bidistillata a 90 °C (3.5% p/v), quindi sono stati aggiunti 3.93 ml di soluzione acquosa contenenti 118 mg di PEG-aldeide (3% p/v) al fine di ottenere il derivato A e 7.86 ml di soluzione acquosa contenenti 236 mg di PEG-Aldeide per ottenere il derivato B. Ad entrambe le dispersioni sono stati aggiunti 2.37 ml di sospensione cellulare raggiungendo una concentrazione finale pari al 3% p/v.

Il GG-EDA è stato, prima, sterilizzato, in forma di liofilizzato, mediante UV a 254 nm, per 30 minuti, utilizzando una lampada UV da 125 W. Successivamente, è stata aggiunta acqua sterile e il polimero disperso a 90°C. La soluzione di PEG-aldeide è

stata sterilizzata mediante filtro da 0.2 μm sotto cappa a flusso laminare e ivi, le due dispersioni sono state miscelate.

Per gli studi biologici sono stati impiegate MC3T3-E1 e HCT-116 coltivate nel *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM) arricchito con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), l'1% v/v di soluzione di penicillina-streptomina, l'1% v/v di soluzione di glutammina e lo 0.1% v/v di soluzione di amfotericina B. Le cellule sono state mantenute all'interno di una fiasca contenente 10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Dopo tripsinizzazione, le cellule sono state contate e risospese in DMEM. Nello specifico, per la caratterizzazione reologica e di vitalità cellulare, sono state impiegate tre diverse densità cellulari, pari rispettivamente a 1×10^7 , 1×10^6 e 1×10^4 cellule/ml, oltre che un bianco di riferimento in cui il volume di sospensione cellulare è stato sostituito da DMEM.

Successivamente, è stata eseguita una caratterizzazione dei *bioinks* attraverso analisi reologiche, studi di *crosslinking* ionotropico e di citocompatibilità *in vitro*.

Per quanto riguarda le prove reologiche, sono stati effettuati test di *oscillation amplitude* e *recovery time* nelle stesse condizioni operative di quelli eseguiti in assenza di cellule. Per l'esecuzione di ciascuna prova sono stati posti 200 μl di ciascun *bioink* all'interno dei pozzetti di una piastra 48-well *cell culture* lasciandoli gelificare a temperatura ambiente, per poi utilizzarli per le analisi in questione.

Relativamente agli studi di *crosslinking* ionotropico, 200 μl di ciascun *bioink* sono stati iniettati in DMEM (1 ml) all'interno di pozzetti di una piastra 48-well *cell culture*. Dopo 7 giorni di incubazione sono state eseguite analisi di *frequency sweep* nelle seguenti condizioni: temperatura costante (37 °C), intervallo di frequenze di oscillazione compreso tra 0.06283 e 62.83 rad/s (0.010-10 Hz), *strain %* costante dell'1.0%.

Riguardo agli studi di citocompatibilità *in vitro*, sono stati eseguiti saggi MTS e *Live&Dead*. In riferimento al primo, 100 μl di ciascun *bioink* sono stati iniettati, attraverso aghi del diametro di 27G, in DMEM (1 ml) all'interno di pozzetti di una piastra 48-well *cell culture*. Le piastre sono state, quindi, incubate a 37 °C e, a tempi prestabiliti (1 e 7 giorni), è stata valutata la vitalità delle cellule mediante il saggio colorimetrico MTS (eseguito seguendo il protocollo riportato dal produttore).

In particolare, ai tempi stabiliti, si è provveduto a togliere il mezzo di coltura, lavare i campioni con DPBS sterile e aggiungere 500 μl di una soluzione di MTS ad ogni

pozzetto. Le piastre sono state incubate per 1.5 ore a 37°C, quindi ne è stata misurata l'assorbanza a 492 nm mediante un lettore *microplate reader* ad assorbanza UV-vis. Le analisi sono state eseguite in triplicato.

Riguardo al saggio *Live&Dead*, 100 µl di ciascun *bioink* sono stati iniettati, sempre attraverso aghi del diametro di 27G, in DMEM (500 µl) all'interno di pozzetti di *2-well Nunc Chamber Slide*, formando sottili filamenti. Quindi sono stati incubati a 37°C e, a tempi prestabiliti (1 e 7 giorni), è stato eseguito il saggio *Live&Dead* (seguendo il protocollo riportato dal produttore).

In particolare, ai tempi stabiliti, si è provveduto a togliere il mezzo di coltura, lavare i campioni con DPBS sterile e aggiungere 500 µl di una soluzione di *Live&Dead* ad ogni pozzetto. Quindi i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 37 °C e, infine, sono state acquisite immagini in fluorescenza con un microscopio AxioVert200 (Zeiss).

5.2.9 Analisi statistica

Tutti i risultati sono riportati come media \pm deviazione standard e, quando applicabile, l'analisi statistica per la significatività è stata eseguita attraverso il Student's t-test, utilizzando la funzione statistica t-test di Microsoft Excel, assumendo una varianza non omogenea a due campioni e una distribuzione a due code; i valori con $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

5.3 Bioink di un derivato dell'acido ialuronico *self-healing* e pH sensibile: sintesi, caratterizzazione e stampabilità

5.3.1 Materiali

L'acido ialuronico 1000 kDa è stato acquistato da Altergon Italia. L'idrossido di tetrabuttilammonio (TBA-OH), la resina a scambio cationico Dowex 50W-X8, il bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC), l'acetone, il dimetilsolfossido anidro (DMSOa), il dietilere, l'idrossido di sodio (NaOH), la dietilentriammina (DETA), il *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS), *Rhodamina B*, *Azure II*, il nitrato di argento (AgNO₃), la fluoresceina diacetato, fluoresceine diacetate (FDA), lo ioduro di propidio (PI), *Live and Dead staining Kit* e gli inserti BRAND[®] sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich. Il glicole etilenico è stato acquistato da Acros organics, Il *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) è stato acquistato da Promega (Italia).

5.3.2 Metodi

La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è stata eseguita utilizzando un sistema dotato di pompa, un rivelatore di indice di rifrazione 2410, tutti acquistati da Waters (TA Instruments - Waters S.p.A., Italia).

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare del protone (¹H-NMR) sono stati registrati utilizzando uno strumento Bruker AC-300 che opera a 300.12 MHz mentre li spettri di risonanza magnetica nucleare bidimensionale (2D-NMR) sono stati registrati utilizzando uno strumento Bruker Avance II 400 MHz.

Le prove reologiche sono state effettuate utilizzando uno strumento DHR-2 TA Instrument dotato di una geometria a piatti piani paralleli di diametro pari a 8 mm con scanalature radiali e di una piastra Peltier auto-riscaldante (TA Instruments - Waters S.p.A.).

Le colture cellulari sono state allestite utilizzando un incubatore Eppendorf New Brunswick S41i.

Il valore di assorbanza per il saggio MTS è stato misurato a 492 nm mediante il microplate reader Thermo (Thermo, UK).

Le misurazioni UV sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Eppendorf AF2200. Gli spettri UV-Visibile sono stati registrati con uno spettrofotometro Shimadzu UV-2400.

Le immagini in fluorescenza sono state acquisite con un microscopio AxioVert200 (Zeiss).

Le immagini di microscopia elettronica a scansione (SEM) sono state acquisite con uno strumento Phenom PRO X. Le analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) sono state effettuate usando uno spettrofotometro di fotoelettroni a raggi X PHI 5000 VersaProbe II (ULVAC-PHI, Inc., Kanagawa, Japan) con una sorgente: Al K α (1486.6 eV), analizzatore emisferico a 128 canali, FAT mode. Le immagini a scansione in trasmissione STEM sono state acquisite con un microscopio Elettronico a Scansione - FEI Versa 3D. Lo strumento Ryonet è stato usato per irradiare i campioni per effettuare la fororiduzione del sale di argento.

Lo studio di rilascio di argento è stato effettuato con la tecnica di spettroscopia di emissione al plasma (ICP-OES) (PerkinElmer Model Optima 2100).

5.3.3 Sintesi HA-DETA e caratterizzazione

5.3.4 Degradazione acido ialuronico ad alto peso molecolare

La degradazione dell'acido ialuronico è stata effettuata partendo da 5 g di prodotto solubilizzato in 500 ml di acqua distillata (100 ml/g). Avvenuta la completa dissoluzione, la soluzione è stata lasciata in *orbital shaker* a 37°C per tutta la notte. Successivamente sono stati aggiunti, sotto agitazione, goccia a goccia, 2 ml di HCl al 37% per ogni grammo di HA. La soluzione è stata posta sotto agitazione per 30 minuti con agitatore a paletta e successivamente è stata trasferita in *orbital shaker* per 24 ore a 37°C. Dopo 24 ore, il pH è stato aggiustato a 7 con NaOH 6 M e la soluzione è stata purificata in dialisi (*cut-off* 3.5 kDa) contro acqua distillata per 7 giorni. Una volta completata la purificazione, il prodotto è stato congelato e liofilizzato.

Avvenuta la completa liofilizzazione, il prodotto è stato solubilizzato in 500 ml di acqua distillata (100 ml/g) ed è stato passato in colonna con resina cationica, precedentemente attivata con HCl.

Il pH della soluzione è stato aggiustato a 7 con tetrabuttilammonio idrossido (TBA-OH), per ottenere il sale di tetrabuttilammonio dell'acido ialuronico (HA-TBA). La soluzione è stata congelata e liofilizzata.

5.3.5 Sintesi e caratterizzazione del derivato dietilentriamminico dell'acido ialuronico (HA-DETA)

Per la sintesi del derivato dietilentriamminico dell'acido ialuronico (HA-DETA), sono stati solubilizzati 500 mg di HA-TBA in 45 ml di DMSO anidro, successivamente una quantità adeguata di paranitrofenilcarbonato (4-NPBC) è stata solubilizzata in 5 ml di DMSO anidro, questi sono stati aggiunti, goccia a goccia, nella soluzione di HA-TBA a 40°C (rapporto molare tra 4-NPBC e HA-TBA pari a 0.25, 0.50 e 0.75).

Dopo 4 ore, 0.218 ml, 0.437 ml e 0.652 ml (rispettivamente per HA-DETA 0.25, 0.50 e 0.75) di dietilentriammina sono stati aggiunti e la soluzione è stata lasciata a 40°C per 3 ore, sotto continua agitazione.

La sintesi è stata conclusa con la precipitazione della miscela di reazione ottenuta di HA-DETA-TBA in un eccesso di dietiletere, 3-4 lavaggi in acetone e purificazione in dialisi (3.5 kDa) contro acqua distillata, successivamente contro NaCl in acqua distillata a pH 5.5 e infine contro acqua bidistillata per un totale di 5 giorni. Dopo la purificazione in dialisi, la soluzione è stata congelata e seccata mediante *freeze-dryer*. La struttura chimica dell'HA-DETA è stata confermata mediante NMR bidimensionale Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) e Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC).

I gruppi amminici presenti sono stati determinati, inoltre, mediante saggio TNBS, seguendo il protocollo di fabbricazione, per confermare il dato di derivatizzazione ottenuto mediante NMR. I derivati sono stati identificati come HA-DETA₁₉, HA-DETA₃₃ e HA-DETA₄₁ riportando un pedice indicante il grado di funzionalizzazione molare.

5.3.6 Studi turbidimetrici

In primo luogo è stata esaminata, attraverso titolazione turbidimetrica, la potenziale interazione elettrostatica tra gruppi amminici della DETA innestata sulla catena di HA e il gruppo carbossilico presente sull'HA stesso. In particolare, i derivati HA-DETA sono stati dispersi (1.0 mg/ml) in acqua bidistillata e il pH di questa soluzione è stato aggiustato a 9.0. A questo punto, HCl 0.1N è stato aggiunto lentamente a temperatura ambiente e il pH è stato misurato utilizzando un pH-metro digitale, con una precisione di 0.01. Le modifiche di torbidità della soluzione a diversi valori di pH sono state

monitorate misurando la trasmittanza (T%) alla lunghezza d'onda di 550 nm, che è inversamente proporzionale all'interazione elettrostatica dei polimeri.

5.3.7 Titolazione potenziometrica

Il derivato con rapporto molare tra 4-NPBC e HA-TBA pari a 0.5 (HA-DETA₃₃) (15 mg) è stato disperso in una soluzione acquosa, CO₂ free, di NaCl 0.1 M (30 ml), utilizzato come stabilizzatore di forza ionica. Quindi, HCl 0.1 N (10 ml) è stato aggiunto alla soluzione risultante e retro-titolato con idrossido di sodio (NaOH) 0.1 M in atmosfera di azoto. La soluzione è stata termostata a 25±0.1 °C e purgata continuamente con azoto durante la titolazione. Il pH-metro è stato calibrato con diverse soluzioni pH standard (pH = 4.01, pH = 7.04, pH = 10.09). I valori di pKa sono stati estrapolati utilizzando *Microsoft Excel* e applicando il metodo de Levie di equilibri chimici acido-basici per acidi poliprotici. Le correzioni delle attività sono state fatte tramite equazione di Davies.

5.3.8 Sintesi e caratterizzazione del derivato aldeidico dell'acido ialuronico (HA-Ald)

300 mg di HA ad alto peso molecolare (1000 KDa) sono stati solubilizzati in 25 ml di acqua distillata e la soluzione è stata lasciata sotto agitazione *overnight*. 169 mg di periodato di sodio (rapporto molare periodato/HA 1:1) sono stati solubilizzati in 5 ml di acqua distillata, ed aggiunti goccia a goccia nella soluzione di HA. La reazione è stata lasciata reagire per 24 ore a temperatura ambiente al buio (in quanto il sodio metaperiodato è sensibile alla luce).

In seguito, la reazione è stata completata con l'aggiunta di un eccesso di glicole etilenico (3 ml). La soluzione è stata lasciata sotto agitazione per 30 minuti, e successivamente è stata purificata in dialisi (3.5 kDa) contro acqua distillata per 5 giorni, congelata ed essiccata mediante *freeze-drying*. L'assenza del periodato è stata verificata aggiungendo ad una aliquota del mezzo di dialisi una soluzione di nitrato d'argento all'1% (p/v). La resa ottenuta è stata di circa 80%.

La presenza dei gruppi aldeidici nell'HA-Ald è stata confermata mediante ATR-FTIR e ¹H-NMR, dissolvendo il campione in D₂O.

Sebbene sia stata evidenziata la presenza dei nuovi picchi nello spettro ¹H-NMR dell'HA-Ald, non è stato possibile quantificare i gruppi aldeidici che sono stati ottenuti

mediante reazione con il periodato. La percentuale dell'aldeide modificata è stata determinata mediante $^1\text{H-NMR}$ trattando l'HA, modificato con aldeide, con carbazato di tert-butile (TBC).

In breve, 20 mg di HA-Ald sono stati dispersi in 2 ml di acqua e in seguito è stata aggiunta una soluzione di TBC 0.5M (con un eccesso molare pari a 10 rispetto alla quantità molare di periodato di sodio precedentemente utilizzato nella preparazione del derivato di HA-Ald).

La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 1 ora a temperatura ambiente, successivamente, è stata aggiunta alla miscela una soluzione acquosa di sodio cianoboroidruro (NaBH_3CN) (stessa quantità molare rispetto al TBC). La miscela è stata lasciata reagire per 24 ore a temperatura ambiente. La soluzione è stata purificata in dialisi con *cut-off* di 3.5 kDa contro acqua bidistillata. Il prodotto ottenuto è stato analizzato tramite $^1\text{H-NMR}$. Il grado di funzionalizzazione aldeidica è stato calcolato dalla quantità di reagente TBC. In particolare, il picco corrispondente al sostituito tert-butil carbazato ($(\text{CH}_3)_3\text{COCONHNH-}$, 1.40 ppm) è stato paragonato al picco corrispondente ai protoni dell'acetammide dell'HA a 2.0 ppm.

Il rapporto tra il segnale del tert-butil a 1.4 ppm e il segnale di N-acetile dell'HA a 2.0 ppm è stato calcolato per accertare il grado di funzionalizzazione aldeidica.

5.3.9 Caratterizzazione mediante *Size-exclusion chromatography* (SEC)

Il peso molecolare medio ponderale (M_w) e l'indice di polidispersità (M_w/M_n) dei derivati HA-DETA e del derivato HA-Ald sono stati determinati mediante analisi SEC utilizzando una colonna Polysep 4000 e un rifrattometro differenziale 410 (DRI) come rivelatore di concentrazione. La miscela tampone fosfato 200 mM (pH 6.5): MeOH 90:10 (v/v) è stata usata come fase mobile, 36 ± 0.1 °C, con un flusso di 0.6 ml/min. La curva di calibrazione è stata determinata utilizzando come standard Pullulano (USA) (Ferguson, et al., 2010). L'analisi è stata eseguita in triplicato.

5.3.10 Preparazione degli idrogeli

L'HA-DETA₃₃ e l'HA-Ald sono stati solubilizzati separatamente in una soluzione salina di tampone fosfato Dulbecco (DPBS, pH 7.4).

Completata la solubilizzazione, l'HA-Ald è stata aggiunta in differenti rapporti molari CHO/NH₂ all'HA-DETA₃₃, e miscelata per qualche secondo, aggiungendo il volume adatto per avere la stessa concentrazione finale in tutti gli idrogel prodotti.

Entrambe le dispersioni di polimero sono state miscelate insieme aggiungendo sotto vigorosa agitazione il volume selezionato di HA-Ald alla dispersione di HA-DETA₃₃. Sono stati ottenuti 4 idrogel siglati 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4, dove il 3 indica la concentrazione finale (3% p/v), F sta per “*feed ratio*” e il numero finale indica il rapporto molare CHO/NH₂ decrescente come riportato in Tabella 6.

5.3.11 Tempo di gelificazione

Il tempo di gelificazione è stato determinato tramite il metodo dell'inversione del tubo. Dopo la miscelazione di HA-DETA₃₃ e HA-Ald a differenti rapporti molari, gli idrogeli sono stati posti in *orbital shaker* a 37°C a 100 rpm invertendo il tubo ogni 10 s e considerando il tempo di gelificazione degli idrogeli quando la miscela ha smesso di fluire dopo l'inversione del tubo. Il *test* è stato eseguito in triplicato.

5.3.12 Crosslinking efficiency

L'efficienza di reticolazione dell'HA-DETA₃₃ con l'HA-Ald, è stata determinata utilizzando il saggio TNBS (Ragothaman, et al., 2014). I prodotti liofilizzati sono stati pesati in modo da avere la stessa quantità di HA-DETA₃₃ in ogni *scaffold* (considerando il rapporto molare dei due derivati). In particolare, sono stati pesati 8.34 mg, 7.14 mg, 6.67 mg e 5.56 mg di 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4, rispettivamente. Ad ogni campione sono stati aggiunti 1 ml di NaHCO₃ al 4% (p/v) e 1 ml di soluzione TNBS allo 0.5% (v/v) preparata in acqua distillata. La soluzione è stata miscelata vigorosamente e mantenuta a 60 °C per 4 ore. Successivamente, ad ogni campione sono stati aggiunti 3 ml di HCl 6M e lasciati a 40 °C per 90 minuti. È stata misurata l'assorbanza massima del complesso trinitrofenile formato utilizzando uno spettrofotometro UV-visibile a 420 nm. L'HA-DETA₃₃ (5mg) è stata trattata, allo stesso modo come controllo.

L'efficienza di reticolazione (ER%) è stata determinata utilizzando l'equazione:

$$ER \% = (Abs \text{ idrogel} / Abs \text{ HA} - \text{DETA}33) \times 100$$

dove Abs idrogel corrisponde all'assorbanza degli idrogeli ai diversi rapporti molari (3F1, 3F2, 3F3 e 3F4) e Abs HA-DETA₃₃ corrisponde all'assorbanza dell'HA-DETA₃₃.

5.3.13 Studi reologici

Per eseguire gli studi reologici, l'HA-DETA₃₃ (3% p/v) e l'HA-Ald (3% p/v) in DPBS, sono stati miscelati come già descritto precedentemente, ai diversi rapporti molari, all'interno della piastra da 48 pozzetti, per ottenere degli idrogeli dalla forma cilindrica che sono stati utilizzati per le analisi. Prima di effettuare l'analisi è stato effettuato un condizionamento del campione al reometro a 25°C per 60 secondi. Le analisi di *strain sweep* nel range da 0.1 a 40% di *strain* sono state eseguite applicando una frequenza costante di 0.1 Hz alla temperatura di 25 °C, per determinare la zona di linearità e valutare la dipendenza del valore del modulo elastico (*storage modulus*), G' , e del modulo viscoso (*loss modulus*), G'' . L'esperimento di *flow sweep* è stato condotto a 25°C per valutare la dipendenza della viscosità all'aumentare dello sforzo di taglio e per avere informazioni sul processo e sulle caratteristiche del materiale analizzato. La dipendenza della viscosità all'aumentare della velocità di taglio è stata valutata applicando un range da 0.01 a 100 s⁻¹.

Un'ulteriore caratterizzazione è stata eseguita con misure di *frequency sweep* per valutare le prestazioni meccaniche delle miscele dei campioni. Le misurazioni del *frequency sweep* sono state eseguite in un intervallo di frequenze di oscillazione comprese tra 0.01 e 10 Hz, applicando una deformazione costante del 1% (zona di linearità).

Il *gap* di misurazione è stato fissato a 1000 µm e il volume finale degli idrogeli era di 200 µl per tutte le analisi. Il campione in eccesso è stato accuratamente rimosso prima di iniziare l'esperimento. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a 25°C in triplicato utilizzando la piastra parallela da 8 mm.

5.3.14 Studi di swelling

Per la determinazione del grado di *swelling* dello *scaffold*, gli idrogeli sono stati preparati come descritto precedentemente. Per lo studio di *swelling* gli idrogeli ottenuti sono stati liofilizzati e pesati. Il peso iniziale è stato indicato con W_i . Gli *scaffolds* sono

stati immersi in 2 ml di DPBS e in 2 ml di tampone fosfato a pH 5.5 a 37°C, quindi il loro peso è stato determinato dopo 1, 6, 24, 48 ore e 7, 14 e 25 giorni.

In particolare, gli *scaffolds* sono stati lavati con acqua deionizzata per rimuovere i sali, e l'eccesso di acqua è stata rimossa delicatamente con filtro in carta. Il peso dopo lo *swelling* è stato indicato come W_s .

Il grado di *swelling* dello *scaffold* è stato calcolato mediante la seguente formula:

$$Q \text{ ratio} = W_s/W_i$$

5.3.15 Determinazione del grado di degradazione dello scaffold

La velocità di idrolisi dello *scaffold* è stata testata *in vitro* tramite l'incubazione dello *scaffold* liofilizzato preparato come descritto sopra, in una soluzione di DPBS e in una soluzione di tampone fosfato a pH 5.5, ed è stata valutata la perdita di peso recuperata dei campioni a 1, 6, 24, 48 ore e 7, 14 e 25 giorni.

Il grado di degradazione è stato calcolando mediante la seguente formula:

$$W_r \% = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

in cui W_f è il peso del campione recuperato (peso finale) ad ogni tempo stabilito, e W_i rappresenta il peso iniziale. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

5.3.16 Proprietà self-healing

La valutazione macroscopica delle proprietà *self-healing* di HA-DETA₃₃/HA-Ald è stata condotta utilizzando uno stampo di forma cilindrica. La soluzione è stata colorata con Azure II e Rhodamina B per ottenere due geli di colore differente. I dischi di idrogel sono stati tagliati in due parti e posti a contatto per valutare la loro capacità di riassemblarsi completamente nella forma precedente a temperatura ambiente.

Dopo aver posto a contatto le due parti sono state scattate foto ogni 5 minuti, le quali mostrano la graduale e completa diffusione del polimero ed è stato osservato la comparsa del colore viola, dovuto alla presenza di entrambi i coloranti.

Inoltre, le soluzioni di differenti colori di HA-DETA₃₃ e HA-Ald sono state direttamente miscelate con la siringa per osservare la miscelazione dei due polimeri.

Infine gli idrogeli sono stati distrutti in pezzi utilizzando un mortaio e un pestello e posti nello stampo per valutare la capacità di *self-healing* e riformazione dell'idrogel. Le proprietà *self-healing* sono state anche visualizzate al microscopio dopo che l'idrogel è stato tagliato in due parti.

Le proprietà di *self-healing* sono state studiate anche da un punto di vista reologico mediante studi di *recovery*. In particolare, le misurazioni del *recovery time* sono state eseguite alla frequenza di 0.1 Hz per caratterizzare il comportamento di recupero del materiale applicando una bassa deformazione del 1% per 100 s, seguita da un'alta deformazione del 500% per 100 s per 7 volte.

5.3.17 Studio della pH sensibilità

Per valutare il diverso comportamento reologico e la loro sensibilità al pH, gli idrogeli sono stati preparati come descritto precedentemente e immersi per 24 ore in DPBS e in tampone fosfato pH 5.5. Su questi campioni sono state eseguite analisi di *frequency sweep* utilizzando i parametri descritti precedentemente.

Gli idrogeli, inoltre, sono stati colorati con Rhodamina B e Azure II per una migliore osservazione. La soluzione di HCl (1 mol/l, 100 μ l) è stata aggiunta all'idrogel agitando delicatamente. Successiva è stata aggiunta una soluzione equivalente di NaOH (1 mol/l, 100 μ l) neutralizzando l'acido. Questo processo è stato ripetuto due volte, per valutare la dinamicità del legame covalente che si forma con la base di Schiff.

5.3.18 Citocompatibilità

Per gli studi biologici *in vitro* sono stati impiegati fibroblasti umani coltivati nel *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM) arricchito con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), l'1% v/v di soluzione di penicillina-streptomina, l'1% v/v di soluzione di glutammina e lo 0.1% v/v di soluzione di amfotericina B. Le cellule sono state mantenute all'interno di una fiasca contenente 10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Dopo tripsinizzazione, le cellule sono state contate e risospese in DMEM. In particolare, le cellule sono state piastrate con una densità pari a 3×10^4 cellule per pozzetto su una piastra a 48 pozzetti. Dopo 24 ore, allo strato cellulare presente nei pozzetti, è stata aggiunta una dispersione polimerica (1 mg/ml) di HA-DETA₃₃ e HA-Ald e, successivamente, tramite saggio colorimetrico MTS (eseguito seguendo il protocollo

riportato dal produttore) è stata valutata la vitalità delle cellule dopo 24 e 48 ore di incubazione.

Inoltre, è stata valutata la citocompatibilità degli idrogeli formati dalla reticolazione dei due derivati ai diversi rapporti molari. Nello specifico, per i test di citocompatibilità, un volume adeguato di HA-DETA₃₃ è stato introdotto all'interno di una piastra a 96 pozzetti e in seguito è stata aggiunta una determinata quantità di HA-Ald per la formazione degli idrogel 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4 direttamente nel pozzetto.

Dopo la formazione dell'idrogel, le cellule ad una densità del 1×10^4 sono state depositate al di sopra di esso per valutarne la citocompatibilità. La stessa analisi è stata eseguita incapsulando le cellule all'interno degli idrogeli ad una densità del 1×10^5 . In particolare, un volume adeguato di HA-DETA₃₃ è stato aggiunto ai pozzetti, successivamente sono state aggiunte le cellule e infine l'HA-Ald. Dopo 24 ore, 48 ore o 7 giorni di incubazione la vitalità è stata valutata tramite saggio colorimetrico MTS (eseguito seguendo il protocollo riportato dal produttore). Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C. L'assorbanza a 492 nm è stata registrata mediante un lettore *microplate reader* ad assorbanza UV-vis e la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di vitalità rispetto alle cellule incubate in presenza del solo mezzo di coltura, che sono state utilizzate come controllo negativo.

Inoltre, agli stessi tempi di incubazione, gli idrogeli con le cellule incapsulate ad una densità di 1×10^5 , sono stati trattati con *Live/Dead Kit* (eseguito seguendo il protocollo riportato dal produttore), in modo da discriminare le cellule vive da quelle morte. Per la visualizzazione è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza.

Per gli studi di citocompatibilità, i campioni sono stati sterilizzati, in forma di liofilizzato, mediante raggi UV a 254 nm, per 20 minuti, utilizzando una lampada UV da 125 W. Successivamente, è stata aggiunto DPBS sterile in modo da ottenere le dispersioni polimeriche.

5.3.19 3D printing

Due dei quattro idrogeli sono stati stampati. In particolare, HA-DETA₃₃ e HA-Ald sono stati preparati al 3% in DPBS separatamente. Una volta portati a pH 7.4, sono stati miscelati nelle diverse concentrazioni molari riportate precedentemente, in particolare sono stati selezionati il 3F2 e il 3F3. I diversi idrogeli sono stati caricati in siringa e stampati con una pressione di ~ 1500 mbar, usando una stampante Zmorph FAB. Sono stati stampati degli *scaffolds*. Il modello digitale è stato prodotto tramite

software Rhinoceros 3D in file STL e processato in file GCODE con il software Voxlizer.

5.3.20 Produzione in situ delle nanoparticelle di argento (AgNPs): Sintesi dei materiali nanocompositi Ag/HA-Deta (senza riduzione UV)

La produzione dei nanocompositi è stata effettuata mediante aggiunta di una soluzione di AgNO_3 all'HA o al derivato HA-DETA₃₃. L'HA è stato utilizzato come controllo. In particolare, idrogeli nanocompositi contenenti AgNPs sono stati ottenuti aggiungendo 100 μl di una soluzione acquosa di AgNO_3 (50 mM) a 15 mg di HA o HA-DETA₃₃ (3.75% p/v) precedentemente disperso in 400 μl di acqua milliQ (il pH è stato aggiustato a 7.4) con una concentrazione finale del 3% (p/v) in HA o HA-DETA₃₃ e 10 mM in AgNO_3 (rapporto in massa di AgNO_3 :HA-DETA₃₃ di 1mg:17.65mg). Le miscele sono state poste sotto rapida agitazione a temperatura ambiente per 72 ore. I campioni ottenuti, come descritto in precedenza, sono stati denominati come Ag/HA e Ag/HA-DETA. A tempi stabiliti (1, 3, 6, 24, 48 e 72 ore), è stata effettuata l'analisi UV-Vis sia di Ag/HA che di Ag/HA-DETA.

5.3.21 Produzione in situ delle nanoparticelle di argento (AgNPs): Sintesi di composti Ag/HA-DETA_UV mediante fotoirradiazione UV

Idrogeli nanocompositi contenenti AgNPs sono stati ottenuti aggiungendo 100 μl di AgNO_3 (a diverse concentrazioni: 5, 25, 50 e 100 mM) a 15 mg di HA-DETA₃₃ (3.75% p/v) precedentemente disperso in 400 μl acqua (il pH è stato aggiustato a 7.4). In particolare, dopo completa dissoluzione è stata aggiunta una soluzione di AgNO_3 , preparata fresca, per ottenere le concentrazioni finali del 3% (p/v) HA-DETA₃₃ e 1, 5, 10 e 20 mM di soluzioni di AgNO_3 . Le miscele sono state poste sotto rapida agitazione a temperatura ambiente per 1 minuto e poi irradiate con luce UV, generata da una lampada a mercurio ad alta pressione (365 nm e 100 W) per 30 minuti in un tubo di quarzo. Il colore della soluzione risultante è cambiato in grigio-marrone dopo 30 minuti di irradiazione UV, indicando la comparsa di nanoparticelle di Ag. I campioni ottenuti sono stati denominati come Ag1/HA-DETA_uv, Ag5/HA-DETA_uv, Ag10/HA-DETA_uv e Ag20/HA-DETA_uv. Dopo l'irradiazione UV, delle aliquote del campione sono state analizzate con l'analisi UV-Vis per verificarne gli spettri di assorbimento così da accertarsi della formazione di nanoparticelle d'argento.

5.3.22 Caratterizzazione chimico-fisica dei nanocompositi

Gli spettri infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR) sono stati registrati sui campioni liofilizzati. Le dimensioni, la morfologia e la topologia superficiale delle particelle di Ag sono state studiate con microscopio a scansione in trasmissione elettronica (STEM) dopo aver diluito il campione 4 volte. In particolare, i campioni sono stati fatti essiccare su film microscopi elettronici prima di effettuare l'analisi.

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) è stata ottenuta su film ottenuti lasciando essiccare il campione su un vetrino porta oggetto.

5.3.23 Attività antibatterica e proprietà antifouling del derivato HA-DETA₃₃

Il campione sottoposto a sperimentazione microbiologica, HA-DETA₃₃, è stato inizialmente solubilizzato in H₂O (5 mg/ml). A partire da questa soluzione è stata preparata la *work solution* in terreno di coltura MH (250 µg/ml), la soluzione di lavoro è stata successivamente sterilizzata per filtrazione. L'attività antimicrobica è stata saggiata alle concentrazioni di 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9, 0.9 µg/ml, contro *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231. L'attività antibiofilm è stata saggiata alle concentrazioni di 50, 25, 10, 5, 2.5 µg/ml, contro *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922 ed *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Per tale valutazione è stato utilizzato un Micrometodo in piastra 96 pozzetti con colorazione della biomassa adesa con crystal-violetto e misurazione della densità ottica dei pozzetti campione, confrontati con pozzetti controllo crescita (non trattati) e pozzetti controllo negativi (solo terreno di coltura e campione a diverse concentrazioni, ma senza l'inoculo microbico). Per ogni concentrazione testata sono state effettuate almeno due repliche. L'attività di inibizione della formazione dei biofilm è stata espressa in termini di percentuale di inibizione a varie concentrazioni µg/ml.

5.3.24 Attività antimicrobica dei nanocompositi Ag/HA-DETA_{uv}

I campioni sottoposti a sperimentazione microbiologica sono stati Ag1/HA-DETA_{uv}, Ag5/HA-DETA_{uv}, Ag10/HA-DETA_{uv} and Ag20/HA-DETA_{uv} preparati come descritto precedentemente alla concentrazione finale del polimero del 3% contenente AgNO₃ alle seguenti concentrazioni: 1, 5, 10 e 20 mM. L'attività antimicrobica è stata saggiata contro batteri Gram-negativi (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) e batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923). I risultati sono stati espressi in termini di concentrazione minima inibente (MIC) in percentuale (v/v). Inoltre, l'attività antibiofilm del Ag10/HA-DETA_{uv} contenente AgNO₃ 10mM è stata saggiata contro *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Il metodo utilizzato è il metodo della conta delle cellule vitali che hanno formato biofilm dopo 24 ore di incubazione in presenza di solo HA-DETA₃₃ o del Ag10/HA-DETA_{uv} contenente AgNO₃ 10mM. I risultati sono stati espressi in termini di unità formanti colonie (CFU) e sono stati confrontati con un controllo crescita (solo ceppi batterici). Per ogni campione sono state effettuate due repliche.

5.3.25 Inibizione formazione di biofilm di Ag10/HA-DETA_{uv}

Al fine di valutare l'attività preventiva sulla formazione di biofilm, una sospensione batterica di *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 è stata aggiunta all'HA-DETA₃₃ o Ag10/HA-DETA_{uv} (50 µl) precedentemente utilizzati per coprire il fondo della camera di una piastra per colture cellulari (Nunc, Roskilde, Danimarca) e incubata a 37 °C per 24 ore. I microorganismi sono stati mantenuti in coltura *overnight* in brodo di soia triptico (TSB), completato con il 2% di glucosio, e successivamente le sospensioni batteriche sono state diluite a OD₅₇₀ = 0.004 e poi inoculate nei pozzetti contenenti HA-DETA₃₃ o Ag10/HA-DETA_{uv} e incubati a 37 °C per 24 ore. Dopo l'incubazione, le camere sono state lavate delicatamente con NaCl 0.9% (due volte) per eliminare le cellule non adese. I campioni sono stati strofinati con un'ansa sterile per prelevare il biofilm adeso sul campione. Il materiale rimosso è stato trasferito in provette contenenti NaCl 0.9% (10 ml totali). Le provette sono poi state sonicate per 3 minuti, il contenuto diluito e seminato su piastra a 37°C. Dopo 24 ore, le cellule batteriche sono state contate ed è stata calcolata la riduzione logaritmica rispetto al controllo crescita.

L'inibizione della formazione del biofilm è stata anche valutata, oltre con il metodo della conta vitale, attraverso colorazione con fluoresceina diacetato (FDA) (colorante fluorescente verde per cellule vive) e ioduro di propidio (PI) (colorazione rosso fluorescente per cellule morte). Dopo aver incubato i campioni in presenza dei ceppi batterici (24 ore, 37°C), come descritto precedentemente, i pozzetti sono stati lavati con PBS (due volte) e incubati con FDA e PI per 15 min. Le immagini sono state catturate ed elaborate utilizzando un microscopio a fluorescenza. Almeno tre immagini sono state catturate su porzioni casuali della superficie dell'idrogel e sulla superficie del vetrino dopo la rimozione dello strato di gel sul fondo.

5.3.26 Studi di citocompatibilità *in vitro* dei nanocompositi

Gli studi di citocompatibilità *in vitro* sono stati eseguiti su MC3T3-E1 (cellule staminali preosteoblastiche murine) coltivati con *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM) come mezzo di coltura, arricchito con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), l'1% v/v di soluzione di penicillina-streptomina, l'1% v/v di soluzione di glutammina e lo 0.1% v/v di soluzione di amfotericina B. Fino all'utilizzo, le cellule sono state mantenute all'interno di una fiasca contenente 10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Dopo tripsinizzazione, le cellule sono state contate e risospese in DMEM. Nello specifico, per i test di citocompatibilità, le cellule sono state piastrate con una densità pari a 2x10⁴ cellule per pozzetto, in una piastra da 24 pozzetti. Dopo 24 ore, allo strato cellulare presente nei pozzetti in 1.5 ml di DMEM, è stata aggiunto l'inserito, nel quale è stato depositato il campione (100 µl) di HA-DETA₃₃, Ag1/HA-DETA_{uv}, Ag5/HA-DETA_{uv}, Ag10/HA-DETA_{uv} o Ag20/HA-DETA_{uv} e, successivamente, tramite saggio colorimetrico MTS (eseguito seguendo il protocollo riportato dal produttore) è stata valutata la vitalità delle cellule dopo 24 e 48 ore di incubazione. Inoltre, agli stessi tempi di incubazione, le cellule sono state trattate con *Live/Dead Kit* (eseguito seguendo il protocollo riportato dal produttore), in modo da discriminare le cellule vive da quelle morte. Per la visualizzazione è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza. Per gli studi di citocompatibilità, l'HA-DETA₃₃ di partenza è stato sterilizzato, in forma di liofilizzato, mediante raggi UV a 254 nm, per 20 minuti, utilizzando una lampada UV da 125 W, mentre la soluzione di AgNO₃ è stata sterilizzata per filtrazione (0.2 µm). Successivamente, i campioni sono stati preparati

in condizioni sterili utilizzando acqua bidistillata in modo da ottenere le dispersioni polimeriche come descritto precedentemente.

5.3.27 Preparazione degli idrogeli AgNPs/HA-DETA/HA-Ald

L'Ag10/HA-DETA_{uv} e l'HA-Ald sono stati dispersi separatamente in acqua bidistillata al 3% p/v; il pH è stato aggiustato a 7 con NaOH 0.1M.

L'HA-Ald è stata aggiunta in differenti rapporti molari CHO/NH₂ all'Ag10/HA-DETA_{uv}, e miscelata per qualche secondo, aggiungendo il volume adatto per avere la stessa concentrazione finale in tutti gli idrogeli prodotti.

Entrambe le dispersioni di polimero sono state miscelate insieme aggiungendo sotto vigorosa agitazione il volume selezionato di HA-Ald alla dispersione di HA-DETA₃₃. Sono stati ottenuti 4 idrogeli siglati 3F1, 3F2, 3F3 e 3F4, dove il 3 indica la concentrazione finale (3% p/v), F sta per “*feed ratio*” e il numero finale indica il rapporto molare CHO/NH₂ decrescente.

5.3.28 Studi di rilascio di argento

Il rilascio di Ag⁺ dagli idrogeli (200 µl), prodotti come descritto nel paragrafo precedente, è stato valutato a pH 7.4 e 5.5. In particolare, a ciascun idrogel sono stati aggiunti 9.8 ml di tampone fosfato pH 7.4 o tampone fosfato pH 5.5. I campioni sono stati incubati a 37°C ed a diversi tempi, 24, 48, 144, 288 e 480 ore per i campioni posti a pH 7.4, e 1, 3, 8 e 21 ore per i campione posti a pH 5.5, è stato analizzato il contenuto di argento presente nel surnatante tramite analisi ICP-OES.

5.4 Solvent-casting 3D printing di nuovi poliuretani con potenziale effetto rigenerativo del tessuto osseo e rilascio loco-regionale di doxorubicina

5.4.1 Materiali

Il polietilenglicole 1000 Da (PEG_{1K}), il polietilenglicole 2000 Da (PEG_{2K}), l'ε-caprolattone (ε-CL), l'L-glutatione ossidato (GSSG), l'L-glutatione ridotto (GSH), l'acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico, l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), il bromuro di litio (LiBr), la dietilammina (DEA), la trietilammina (TEA), gli standard di polistirene, la sodio azide (NaN₃), le nanoparticelle di idrossiapatite (nHAp), il *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS), gli inserti BRAND®, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich srl (Italia). L'idruro di calcio (CaH₂), lo stannato di ottilite Sn(Ot)₂, il trimetilclorosilano (TMCISi), l'1,4-diisocianatobutano (BDI) sono stati acquistati da Fluka. La N,N-dimetilformamide (DMF), il dietil etere, il diclorometano (DCM), il toluene, il metanolo, l'isopropanolo, l'etere di petrolio e l'acetone sono stati acquistati da VWR (Italia). Il ditiotreitolo (DTT), il solfito di sodio (Na₂SO₃) 98% e la glicina sono stati acquistati dalla Merck (Germania).

5.4.2 Sintesi dei copolimeri tri-block PolyCE

I copolimeri *triblock* PCL-PEG-PCL, denominati PolyCE sono stati sintetizzati attraverso una procedura di *Ring Opening Polymerization* (ROP), impostando due differenti rapporti molari tra l'ε-caprolattone (C) ed il PEG (E) pari a 12.26 e 24.52, rispettivamente.

I due reagenti sono stati distillati. In particolare, la distillazione dell'ε-caprolattone è stata effettuata a 90 °C in presenza di calcio idruro. I PEG con peso molecolare 1000 (PEG_{1K}) e 2000 (PEG_{2K}), sono stati disidratati tramite distillazione azeotropica in toluene a pressione atmosferica. Sfruttando un rapporto volumetrico 1:4 (v/v) PEG/toluene, l'azeotropo distilla a 76°C.

La sintesi dei copolimeri è stata effettuata in atmosfera inerte di azoto, a 130 °C in una piastra ad olio, sotto agitazione, per 24 ore, utilizzando palloni a due colli dotati di rubinetto, seguendo la modalità riportata in letteratura (Palumbo, et al., 2021).

In particolare, per soddisfare il rapporto molare C/E di 12.26, 1.6 g di ε-caprolattone sono stati miscelati con 1.128 g di PEG_{1K} e 0.79 g di ε-caprolattone sono stati miscelati con 1.128 g di PEG_{2K}; mentre per soddisfare il rapporto C/E di 24.56 sono stati

utilizzati 3.16 g di ϵ -caprolattone e 1.128g di PEG_{1k} e 1.6 g di ϵ -caprolattone sono stati miscelati con 1.128 g di PEG_{2k}. Per tutte le reazioni è stata utilizzato lo stannato di ottilite Sn(Ot)₂ come catalizzatore. I quattro differenti copolimeri ottenuti sono stati identificati rispettivamente con le sigle PolyC₁₂E_{1K}, PolyC₂₄E_{1K}, PolyC₁₂E_{2K}, PolyC₂₄E_{2K}.

Al termine delle 24 ore, i copolimeri semisolidi sono stati purificati tramite precipitazione goccia a goccia in dietilere, a freddo e sotto vigorosa agitazione. Sono stati poi posti una notte in isopropanolo a 4°C ed infine essiccati.

I prodotti sono stati ottenuti come solidi di colore bianco ad eccezione del PolyC₁₂E_{1k} che è stato ottenuto come un liquido viscoso.

5.4.3 Sintesi del Chain extender

L'esterificazione dell'L-glutatione ossidato per ottenere il tetrametilestere è stata eseguita impostando un rapporto molare tra trimetilclorosilano e L-glutatione ossidato pari a 24; pertanto a 1g di L-glutatione ossidato sono stati aggiunti 4.95 ml di trimetilelorosilano goccia a goccia e sotto agitazione, aggiungendo poi 10 ml di metanolo, secondo le modalità precedentemente riportate (Palumbo, et al., 2021). La reazione è stata condotta a 25 °C per 24 ore. A seguito delle 24 ore, la miscela è stata concentrata al rotavapor fino all'ottenimento di un residuo oleoso, purificato con 2 ml di etere di petrolio. Infine, il prodotto è stato essiccato con l'ottenimento di una polvere bianca.

5.4.4 Sintesi dei poliuretani

La sintesi dei poliuretani è stata condotta seguendo la procedura riportata in letteratura (Palumbo, et al., 2021), soddisfacendo il rapporto PolyCE:BDI:GSSG-OMe₄ pari a 1:2.3:1 per tutti i poliuretani sintetizzati, che sono stati identificati come PolyC_xE_yGS dove x indica il rapporto molare ϵ -PCL/PEG usato e y indica il peso molecolare del PEG (1K o 2K).

Tutte le reazioni sono state condotte sotto agitazione e in atmosfera inerte, in palloni a due colli, in particolare:

PolyC₁₂E_{1K}GS: 400 mg di PolyC₁₂E_{1K} sono stati dispersi in 368 μ l di DMF anidra (115% p/p) aggiungendo 25.9 μ l di BDI e 20 μ l 0.05 M di Sn(Ot)₂ come catalizzatore (70°C per 2 ore); successivamente per la fase di estensione, i palloni sono stati posti

in bagno a 0°C e si è proceduto all'aggiunta di 180 mg di tetrametilestere dell'L-glutazione ossidato cloridrato (GSSG-OMe₄) precedentemente solubilizzati in 2.97 ml di DMF anidra ed in presenza di 12.2 µl di DEA. Dopo 2 ore la reazione è stata portata a termine a 25 °C per ulteriori 20 ore.

PolyC₂₄E_{1k}GS: 400 mg di PolyC₂₄E_{1k} sono stati dispersi in DMF anidra al 115% p/p con 59.8 µl di BDI e 20 µl 0.05 M di Sn(Ot)₂ (70°C per 2 ore); successivamente i palloni sono stati posti in bagno a 0°C e si è proceduto all'aggiunta di 79.4 mg di GSSG (OMe)₄ in 1.29 ml di DMF anidra ed in presenza di 12.2 µl di DEA . Dopo 2 ore la reazione è stata portata a termine a 25 °C per ulteriori 20 ore.

PolyC₁₂E_{2k}GS: 400 mg di PolyC₁₂E_{2k} sono stati dispersi in DMF anidra al 115% p/p aggiungendo 41.2 µl di BDI e 20 µl 0.05 M di Sn(Ot)₂ (70°C per 2 ore); successivamente i palloni sono stati posti in bagno a 0°C e si è proceduto all'aggiunta di 125 mg di GSSG (OCH₃)₄ in 2.04 ml di DMF anidra con 19.3 µl di DEA . Dopo 2 ore la reazione è stata portata a termine a 25 °C per ulteriori 20 ore.

PolyC₂₄E_{2k}GS: 400 mg di PolyC₂₄E_{2k} sono stati dispersi in DMF anidra al 115% p/p aggiungendo 30.9 µl di BDI e 20 µl 0.05 M di Sn(Ot)₂ (70°C per 2 ore); successivamente i palloni sono stati posti in bagno a 0°C e si è proceduto all'aggiunta di 89.3 mg di GSSG (OCH₃)₄ in 1.45 ml di DMF anidra con 13.76 µl di DEA . Dopo 2 ore la reazione è stata portata a termine a 25 °C per ulteriori 20 ore.

Ciascuna reazione è stata interrotta precipitando in dietiletere a freddo, sotto vigorosa agitazione, ottenendo quindi i precipitati che sono stati purificati tramite ripetuti lavaggi in isopropanolo ed infine essiccati sotto vuoto. I derivati **PolyC₂₄E_{1k}GS**, **PolyC₁₂E_{2k}GS** e **PolyC₂₄E_{2k}GS** sono stati ottenuti come prodotti polverulenti mentre il **PolyC₁₂E_{1k}GS** è stato ottenuto con una consistenza semisolida.

5.4.5 Caratterizzazione

Gli spettri di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) sono stati registrati in range compreso tra 500 e 4000 cm⁻¹, con uno strumento Bruker Alpha.

Gli spettri ¹H-NMR sono stati ottenuti con uno strumento Bruker Avance II 300 funzionante a 300.12 MHz a temperatura ambiente, usando DMF deuterata come solvente per i PolyCEGS, metanolo deuterato come solvente per l'L-glutazione

ossidato e il suo derivato e cloroformio deuterato per i PolyCE. I *chemical shift* (δ) sono riportati come parti per milione (ppm) a valle del tetrametilsilano.

Il peso molecolare medio pesato (Mw), il peso molecolare medio numerico (Mn) e l'indice di polidispersità (PDI) dei derivati sono stati determinati tramite *Size Exclusion Chromatography* (SEC). L'analisi cromatografica ad esclusione dimensionale è stata eseguita utilizzando un sistema SEC multidetector dotato di una pompa Water 600 (Mildford, MA), un rilevatore di indice di rifrazione Water 410 e una colonna Phenogel lineare da Phenomenex (dimensione delle particelle 5 μm ; dimensione dei pori 100 nm e 1 μm). Come standard è stato utilizzato polistirene (intervallo 2-70 kDa). Le misurazioni sono state eseguite a $50\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ usando una soluzione di LiBr/DMF 0.025 M come eluente, con un flusso di 0.8 ml/min.

L'analisi termica (DSC) dei campioni è stata eseguita utilizzando un DSC 131 EVO, SETARAM Instruments. I campioni sono stati riscaldati da $-100\text{ }^\circ\text{C}$ a $+100\text{ }^\circ\text{C}$ con una velocità di riscaldamento di $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

La quantificazione dell'estere tetrametilico dell'L-glutazione ossidato cloridrato GSSG-OMe₄, usato come *chain extender* nel protocollo sintetico dei poliuretani, è stata effettuata valutando la quantità di ponti S-S mediante saggio colorimetrico DTNB, seguendo la procedura riportata da Thannhauser. In particolare, 100 μl di campione disciolto in DMF sono stati diluiti in 1.5 ml di soluzione di DTNB a pH 9.5. Dopo 25 minuti al buio, è stata letta l'assorbanza a 412 nm all'UV. La quantità di GSSG incorporato è stata quantificata utilizzando il derivato GSSG-OMe₄ come standard nell'intervallo 0.1-1 mg/ml. I risultati sono stati espressi come μmol di legami disolfuro per grammo di campione. I valori di assorbanza per il saggio di Thannhauser sono stati ottenuti tramite Eppendorf PlateReader AF2200.

L'analisi spettroscopica UV-Vis, per valutare il rilascio di Doxorubicina, è stata effettuata usando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401PC.

5.4.6 Studi di degradazione idrolitica

Gli *scaffolds* sono stati ottenuti disperdendo il **PolyC₂₄E_{1k}GS** al 50% p/v in DCM e la dispersione è stata versata in un supporto in Teflon per favorire la formazione di un film. A seguito dell'evaporazione del DCM sono stati ricavati dei dischetti (diametro 1 cm, spessore 1 mm), utilizzando una fustellatrice (N. 6); in seguito sono stati

sciacquati in acqua distillata e liofilizzati. Al termine della liofilizzazione, i campioni sono stati pesati ricavando il peso al tempo 0 (t_0).

Gli *scaffolds* sono stati posti in 1.5 ml di due mezzi differenti, una soluzione di DPBS a pH 7.4 e una soluzione di GSH 10 mM in DPBS a pH 7.4, entrambi in NaN_3 (0.01% p/p) per evitare la crescita microbica.

Le analisi sono state effettuate in triplicato per 5 tempi (1, 4, 18, 42 e 75 giorni), con sostituzione del mezzo con mezzo fresco ogni 3 giorni, posti in *orbital shaker* a 37 °C. Per ogni tempo è stato valutato il grado di rigonfiamento, espresso come rapporto tra il peso del film rigonfio al tempo t_n sul peso del film secco.

La degradazione è stata calcolata come peso residuo percentuale:

$$(W_r\%) = \left(W_{t_n} / W_{t_0} \right) \times 100$$

dove W_{t_n} è il peso del film al tempo n, mentre W_{t_0} è il peso del film al tempo 0.

5.4.7 Stampa dei poliuretani

Sono state eseguite diverse prove di stampa del **PolyC₂₄E_{1k}GS**, sia a diverse concentrazioni di polimero che in presenza di nanoparticelle di idrossiapatite (nHAp), a loro volta a diverse concentrazioni. La concentrazione di idrossiapatite che è stata utilizzata è pari al 3% p/p, mentre la concentrazione del polimero è pari al 20% p/p. In particolare, 333 mg di **PolyC₂₄E_{1k}GS** sono stati miscelati a 50 mg di nHAp e dispersi in 1 ml di DCM agitando con il vortex per circa 15 minuti. Il semisolido è stato poi caricato in siringa e stampato a bassa velocità, 1 mm/s, con una pressione di 8000 mbar controllata tramite un sensore di flusso posto a valle, tramite un ago con diametro nominale esterno di 0.45 mm, ovvero 27 Gauge, usando una stampante Zmorph FAB, alla velocità di 1 mm/s.

Sono stati stampati degli *scaffolds* a forma di griglia dalle dimensioni di 10 × 10 × 1.2 mm, ottenuti tramite modello digitale ricavato mediante il *software* Rhinoceros 3D in file STL e processato in file GCODE con il *software* Voxlizer.

5.4.8 Studi di degradazione idrolitica sugli scaffolds 3D printed

Gli *scaffolds 3D printed* sono stati ottenuti disperdendo il **PolyC₂₄E_{1k}GS** al 20% p/p in DCM e il **PolyC₂₄E_{1k}GS + nHAp** al 20% in DCM. Le dispersioni sono state

stampate seguendo la tecnica del *solvent casting*. A seguito dell'evaporazione del DCM, sono stati lavati in acqua distillata e liofilizzati. Al termine della liofilizzazione, i campioni sono stati pesati ricavando il peso al tempo 0 (t_0).

Gli *scaffolds* sono stati posti in 1.5 ml di quattro mezzi differenti, una soluzione di DPBS a pH 7.4, una soluzione di DPBS a pH 5.5, una soluzione di GSH 10 mM in DPBS a pH 7.4 ed infine una soluzione di GSH 10 mM in DPBS a pH 5.5, tutti e quattro in NaN_3 (0.01% p/p) per evitare la crescita microbica.

Le analisi sono state effettuate *in orbital shaker* a 37 °C e in triplicato per 5 tempi (1, 7, 14, 21 e 28 giorni), con sostituzione del mezzo con mezzo fresco ogni 3 giorni.

Per ogni tempo è stato valutato il grado di rigonfiamento, espresso come rapporto tra il peso dello *scaffold* rigonfio al tempo t_n sul peso del film secco.

La degradazione è stata calcolata come peso residuo percentuale

$$(W_r\%) = \left(W_{t_n} / W_{t_0} \right) \times 100.$$

dove W_{t_n} è il peso del film al tempo n , mentre W_{t_0} è il peso del film al tempo 0.

5.4.9 Studi di citocompatibilità *in vitro*

Gli studi di citocompatibilità *in vitro* sono stati eseguiti su osteoblasti coltivati con *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM) come mezzo di coltura, arricchito con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), l'1% v/v di soluzione di penicillina-streptomina, l'1% v/v di soluzione di glutammina e lo 0.1% v/v di soluzione di amfotericina B. Fino all'utilizzo, le cellule sono state mantenute all'interno di una fiasca contenente 10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO_2 . Dopo tripsinizzazione, le cellule sono state contate e risospese in DMEM. Nello specifico, per i test di citocompatibilità, le cellule sono state piastrate con una densità pari a 3×10^4 cellule per *scaffold*, previamente sterilizzati con etanolo e lavati più volte con DPBS sterile, in una piastra da 48 pozzetti. In particolare, 200 μl della sospensione cellulare contenente 3×10^4 cellule, sono stati delicatamente posti sullo *scaffold*. Dopo 30 minuti è stato aggiunto 1 ml di mezzo di coltura e la piastra è stata incubata per le prove di citocompatibilità a 3, 7 e 14 giorni. Trascorsi i tempi prestabiliti, la vitalità delle cellule è stata valutata tramite saggio colorimetrico MTS, seguendo la procedura riportata dal produttore. In particolare, dopo 3, 7 e 14 giorni di incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito in ogni

pozzetto con 150 μ l di una soluzione costituita da DMEM e una soluzione di MTS (100:20). Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C. L'assorbanza a 492 nm è stata registrata mediante un lettore *microplate reader* ad assorbanza UV-vis e la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di vitalità rispetto alle cellule caricate su uno *scaffold* di PCL che sono state utilizzate come controllo positivo.

Inoltre, dopo 3 giorni di incubazione, le cellule sono state trattate con *Live and Dead staining kit assay*, in modo da discriminare le cellule vive da quelle morte. Per la visualizzazione è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza.

5.4.10 Caricamento di Doxorubicina e studi di rilascio

Per il caricamento del farmaco sono stati prodotti due *scaffolds* differenti. Per ogni *scaffold*, 500 μ g di Doxorubicina cloridrato sono stati solubilizzati in 1 ml di MeOH; questa soluzione è stata aggiunta goccia a goccia alla polvere di poliuretano e nHAp, rispettivamente 434.8 mg e 55.22 mg; e alla polvere di solo poliuretano, 500 mg, in un mortaio, miscelando e facendo allontanare il solvente. Una volta ottenuta una miscela omogenea, i due polimeri sono stati essiccati per 24 ore.

A seguito delle 24 ore, i due polimeri, opportunamente pesati, sono stati dispersi alla concentrazione 20% p/p in DCM e caricati in siringa per la stampa.

Gli *scaffolds* (circa 25 mg) sono stati posti in quattro mezzi di controllo differenti per valutare il comportamento del rilascio nelle diverse condizioni. I mezzi utilizzati sono stati: DPBS a pH 7.4; GSH 10mM in DPBS a pH 7.4; DPBS a pH 5.5 e GSH 10 mM in DPBS a pH 5.5. A diversi tempi, 1, 24 e 48 ore e 7, 14 e 21 giorni, il rilascio è stato valutato tramite analisi UV prelevando un'aliquota del mezzo in cui erano stati posti gli *scaffolds* e valutandone l'assorbanza a 480 nm.

5.4.11 Studi di citotossicità in vitro e determinazione della concentrazione inibente 50 (IC₅₀)

La valutazione della IC₅₀ della Doxorubicina, e gli studi di citotossicità *in vitro*, sono stati eseguiti sulla linea cellulare HCT-116 coltivata in mezzo di coltura McCoy. Le cellule sono state mantenute all'interno di una fiasca contenente 10 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. In particolare, per la valutazione della IC₅₀, a seguito della tripsinizzazione, le cellule sono state contate e risospese in McCoy e piastrate in una piastra da 96 pozzetti con

una densità cellulare di 1×10^4 cellule a pozzetto, coperte poi con soluzioni crescenti di Doxorubicina (0.05-50 μ M). Dopo 24 ore di incubazione, è stato eseguito il saggio MTS, secondo la procedura riportata dal produttore. Il mezzo di coltura è stato sostituito in ogni pozzetto con 150 μ l di una soluzione costituita da McCoy e una soluzione di MTS (100:20). La piastra è stata incubata per 30 minuti a 37°C. L'assorbanza a 492 nm è stata registrata mediante un lettore *microplate reader* ad assorbanza UV-vis e il valore della IC₅₀ è stato ricavato dal grafico espresso come percentuale di vitalità in funzione della concentrazione di farmaco.

Per valutare la citotossicità degli *scaffolds* sia di PolyC₂₄E_{1k}GS+nHAp che di PolyC₂₄E_{1k}GS, caricati con la Doxorubicina, le cellule, una volta tripsinizzate, sono state risospese e piastrate in una piastra da 24 pozzetti, in particolare 2×10^4 cellule in 1 ml di McCoy. Dopo essere state incubate per 24 ore, su ogni pozzetto è stato inserito un inserto, BRAND®, contenente lo *scaffold* con il farmaco a cui è stato aggiunto 1 ml di mezzo. Il saggio è stato eseguito in triplicato e sono stati utilizzati due *scaffolds* in PolyC₂₄E_{1k}GS +nHAp e PolyC₂₄E_{1k}GS, come sistema di controllo. La piastra è stata incubata per 48 ore a 37°C. Al termine del tempo prestabilito, gli inserti sono stati rimossi, ed è stato eseguito il saggio MTS sostituendo il mezzo di coltura con 150 μ l di una soluzione costituita da McCoy e una soluzione di MTS (100:20). L'assorbanza a 492 nm è stata registrata mediante un lettore *microplate reader* ad assorbanza UV-vis. I dati sono stati riportati in vitalità %, ottenuta rapportando i valori di assorbanza delle cellule incubate in presenza dello *scaffold* rispetto a quelle utilizzate come controllo negativo. Inoltre, per visualizzare l'endocitosi della Doxorubicina, le cellule sono state fissate con 150 μ l di formaldeide 4%, lavate in DPBS e trattate con 150 μ l di Dapi, colorante organico fluorescente, per visualizzare il nucleo delle cellule al microscopio a fluorescenza, paragonando le immagini in Dapi con quelle in Texasred che mostrano invece la presenza del farmaco all'interno delle cellule.

Dopo 24 e 72 ore dalla prima incubazione degli *scaffolds*, ulteriori 2×10^4 cellule sono state piastrate come precedentemente descritto, per il successivo trasferimento degli stessi *scaffolds* e la valutazione della citotossicità a 96 e 168 ore.

6. Bibliografia

- Abbadessa, A., Blokzijl, M. M., Mouser, V. H. M., Marica, P., Malda, J., Hennink, W. E., & Vermonden, T. (2016a). A thermo-responsive and photo-polymerizable chondroitin sulfate-based hydrogel for 3D printing applications. *Carbohydrate Polymers*, 149, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.080>
- Abbadessa, A., Mouser, V. H. M., Blokzijl, M. M., Gawlitta, D., Dhert, W. J. A., Hennink, W. E., ... Vermonden, T. (2016b). A Synthetic Thermosensitive Hydrogel for Cartilage Bioprinting and Its Biofunctionalization with Polysaccharides. *Biomacromolecules*, 17(6), 2137–2147. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00366>
- Abdel-Mohsen, A. M., Hrdina, R., Burgert, L., Abdel-Rahman, R. M., Hašová, M., Šmejkalová, D., Kolář, M., Pekar, M., Aly, A. S. (2013). Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1177–1187, 0144–8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.098>.
- Agnello, S., Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2018). Synthesis and evaluation of thermo-rheological behaviour and ionotropic crosslinking of new gellan gum-alkyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 185, 73–84. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.01.021>
- Ahlfeld, T., Cidonio, G., Kilian, D., Duin, S., Akkineni, A. R., Dawson, J. I., Yang, S., Lode, A., Oreffo, R.O.C., Gelinsky, M. (2017) Development of a clay based bioink for 3D cell printing for skeletal application. *Biofabrication*, 9(3), 034103.
- Ahn, G., Min, K. H., Kim, C., Lee, J. S., Kang, D., Won, J. Y., ... Shim, J. H. (2017). Precise stacking of decellularized extracellular matrix based 3D cell-laden constructs by a 3D cell printing system equipped with heating modules. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09201-5>
- Ailincăi, D., Mititelu-Tartau, L., & Marin, L. (2020). Citryl-imine-PEG-ylated chitosan hydrogels – Promising materials for drug delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1323–1337. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.218>
- Akaraonye, E., Filip, J., Safarikova, M., Salih, V., Keshavarz, T., Knowles, J. C., & Roy, I. (2016). Composite scaffolds for cartilage tissue engineering based on natural polymers of bacterial origin, thermoplastic poly(3-hydroxybutyrate) and micro-fibrillated bacterial cellulose. *Polymer International*, 65(7), 780–791. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.5103>
- Albritton, J. L., & Miller, J. S. (2017). 3D bioprinting: Improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(1), 3–14. <https://doi.org/10.1242/dmm.025049>
- Almela, T., Al-Sahaf, S., Brook, I. M., Khoshroo, K., Rasoulianboroujeni, M., Fahimipour, F., ... Moharamzadeh, K. (2018). 3D printed tissue engineered model for bone invasion of oral cancer. *Tissue and Cell*, 52, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.009>
- Askari, M., Afzali Naniz, M., Kouhi, M., Saberi, A., Zolfagharian, A., & Bodaghi, M. (2021). Recent progress in extrusion 3D bioprinting of hydrogel biomaterials for tissue regeneration: A comprehensive review with focus on advanced fabrication techniques. *Biomaterials Science*, 9(3), 535–573. <https://doi.org/10.1039/d0bm00973c>
- Athukoralalage, S. S., Balu, R., Dutta, N. K., & Choudhury, N. R. (2019). 3D bioprinted nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering applications: A brief review. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym11050898>
- Bacelar, A. H., Silva-Correia, J., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2016). Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 4, pp. 6164–6174. <https://doi.org/10.1039/c6tb01488g>
- Bahal, R., Mcneer, N. A., Quijano, E., Liu, Y., Sulkowski, P., Turchick, A., ... Glazer, P. M. (2016). In vivo correction of anaemia in β -thalassemic mice by γ PNA-mediated gene editing with nanoparticle delivery. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13304>

- Bajaj, P., Schweller, R. M., Khademhosseini, A., West, J. L., & Bashir, R. (2014). 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105155>
- Bakker, M. H., Grillaud, M., Wu, D. J., Fransen, P.-P. K. H., de Hingh, I. H., & Dankers, P. Y. W. (2018). Cholesterol Modification of an Anticancer Drug for Efficient Incorporation into a Supramolecular Hydrogel System. *Macromolecular Rapid Communications*, 39(17), 1800007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/marc.201800007>
- Banerjee, S. L., & Singha, N. K. (2017). A new class of dual responsive self-healable hydrogels based on a core crosslinked ionic block copolymer micelle prepared via RAFT polymerization and Diels–Alder “click” chemistry. *Soft Matter*, 13(47), 9024–9035. <https://doi.org/10.1039/C7SM01906H>
- Barnes, H. A. (1999). The yield stress—a review or ‘παντα ρει’—everything flows? *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 81(1–2), 133–178. [https://doi.org/10.1016/S0377-0257\(98\)00094-9](https://doi.org/10.1016/S0377-0257(98)00094-9)
- Barrioni, B. R., De Carvalho, S. M., Oréfice, R. L., De Oliveira, A. A. R., & Pereira, M. D. M. (2015). Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 52, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.027>
- Bartnikowski, M., Bartnikowski, N. J., Woodruff, M. A., Schrobback, K., & Klein, T. J. (2015). Protective effects of reactive functional groups on chondrocytes in photocrosslinkable hydrogel systems. *Acta Biomaterialia*, 27, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.038>
- Bastings, M. M. C., Koudstaal, S., KIELTYKA, R. E., Nakano, Y., Pape, A. C. H., Feyen, D. A. M., ... Dankers, P. Y. W. (2014). A Fast pH-Switchable and Self-Healing Supramolecular Hydrogel Carrier for Guided, Local Catheter Injection in the Infarcted Myocardium. *Advanced Healthcare Materials*, 3(1), 70–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201300076>
- Bayer, O. (1947). Polyurethane Paper von Bayer. *Angewandte Chemie*, 59(9), 257–288.
- BeMiller, J. N. (1996). Structure-Property Relationships of Water-Soluble Polysaccharides. *J. Appl. Glycosci.*, 43(3), 377–384.
- Bencherif, S. A., Srinivasan, A., Horkay, F., Hollinger, J. O., Matyjaszewski, K., & Washburn, N. R. (2008). Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*, 29(12), 1739–1749. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.047>
- Bercea, M., Gradinaru, L. M., Mandru, M., Tigau, D. L., & Ciobanu, C. (2019). Intermolecular interactions and self-assembling of polyurethane with poly(vinyl alcohol) in aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*, 274, 562–567. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.018>
- Bhattacharai, N., Ramay, H. R., Gunn, J., Matsen, F. A., & Zhang, M. (2005). PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release*, 103(3), 609–624. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2004.12.019>
- Billiet, T., Gevaert, E., De Schryver, T., Cornelissen, M., & Dubruel, P. (2014). The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*, 35(1), 49–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.078>
- Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2016). Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Advanced Healthcare Materials*, 5(3), 326–333. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500677>
- Boehm, R. D., Miller, P. R., Hayes, S. L., Monteiro-Riviere, N. A., & Narayan, R. J. (2011). Modification of microneedles using inkjet printing. *AIP ADVANCES*, 1, 22139. <https://doi.org/10.1063/1.3602461>
- Breitenbach, M., & Hoffmann, J. (2018). Editorial: Cancer models. *Frontiers in Oncology*, 8(OCT), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00401>
- Burdick, J. A., & Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 23(12), H41–H56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201003963>

- Campbell, P. G., & Weiss, L. E. (2007). Tissue engineering with the aid of inkjet printers. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(8), 1123–1127. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.8.1123>
- Campos, D. F. D., Marquez, A. B., O'seanain, C., Fischer, H., Blaeser, A., Vogt, M., ... Aveic, S. (2019). Exploring cancer cell behavior in vitro in three-dimensional multicellular bioprintable collagen-based hydrogels. *Cancers*, 11(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers11020180>
- Cao, N., Chen, X. B., & Schreyer, D. J. (2012). Influence of Calcium Ions on Cell Survival and Proliferation in the Context of an Alginate Hydrogel. *ISRN Chemical Engineering*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.5402/2012/516461>
- Cao, X., Zhang, P., Guo, N., Tong, Y., Xu, Q., Zhou, D., & Feng, Z. (2021). Self-healing solid polymer electrolyte based on imine bonds for high safety and stable lithium metal batteries. *RSC Advances*, 11(5), 2985–2994. <https://doi.org/10.1039/D0RA10035H>
- Caracciolo, P. C., Buffà, F., & Abraham, G. A. (2009). Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly(esterurethanes). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3561-8>
- Carletti, E., Motta, A., & Migliaresi, C. (2011). Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology* (Vol. 695, pp. 17–39). <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0>
- Chandrasekaran, R., & Radha, A. (1995). Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 6(5), 143–148.
- Chang, R., Nam, J., & Sun, W. (2008). Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Engineering. Part A*, 14(1), 41–48.
- Chen, D., Wu, M., Li, B., Ren, K., Cheng, Z., Ji, J., ... Sun, J. (2015). Layer-by-Layer-Assembled Healable Antifouling Films. *Advanced Materials*, 27(39), 5882–5888. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201501726>
- Chen, D. X. B. (2018a). Extrusion bioprinting of scaffolds for tissue engineering applications. In *Extrusion Bioprinting of Scaffolds for Tissue Engineering Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03460-3>
- Chen, L., Yan, C., & Zheng, Z. (2018c). Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. *Materials Today*, 21(1), 38–59. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.002>
- Chen, Q., Mangadla, J. D., Wallat, J., De Leon, A., Pokorski, J. K., & Advincula, R. C. (2017). 3D printing biocompatible polyurethane/poly(lactic acid)/graphene oxide nanocomposites: Anisotropic properties. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(4), 4015–4023. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11793>
- Chen, W.-H., Lo, W.-C., Hsu, W.-C., Wei, H.-J., Liu, H.-Y., Lee, C.-H., ... Deng, W.-P. (2014). Synergistic anabolic actions of hyaluronic acid and platelet-rich plasma on cartilage regeneration in osteoarthritis therapy. *Biomaterials*, 35(36), 9599–9607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.058>
- Chen, W., Duan, W., Liu, Y., Wang, Q., & Qi, F. (2019). Facile Fabrication of Multifunctional Polymer Composites Based on Three-Dimensional Interconnected Networks of Graphene and Carbon Nanotubes. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b04854>
- Chimene, D., Lennox, K. K., Kaunas, R. R., & Gaharwar, A. K. (2016). Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(6), 2090–2102.
- Choi, J., Kwon, O., Jo, W., Lee, H., & Moon, M. (2015). 4D Printing Technology: A Review. *3D Printing and Additive Manufacturing*, 2(4), 159–167.
- Choi, Y.-J., Kim, T. G., Jeong, J., Yi, H.-G., Park, J. W., Hwang, W., & Cho, D.-W. (2016). 3D Cell Printing of Functional Skeletal Muscle Constructs Using Skeletal Muscle-Derived Bioink. *Advanced Healthcare Materials*, 5(20), 2636–2645. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201600483>

- Chung, J. H. Y., Naficy, S., Yue, Z., Kapsa, R., Quigley, A., Moulton, S. E., & Wallace, G. G. (2013). Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science*, 1(7), 763–773. <https://doi.org/10.1039/c3bm00012e>
- Cidonio, G., Glinka, M., Dawson, J. I., & Oreffo, R. O. C. (2019). The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine. *Biomaterials*, 209, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.009>
- Colosi, C., Shin, S. R., Manoharan, V., Massa, S., Costantini, M., Barbetta, A., . . . Khademhosseini, A. (2016). Microfluidic Bioprinting of Heterogeneous 3D Tissue Constructs Using Low-Viscosity Bioink. *Advanced Materials*, 28(4), 677–684.
- Colson, Y. L., & Grinstaff, M. W. (2012). Biologically responsive polymeric nanoparticles for drug delivery. *Advanced Materials*, 24(28), 3878–3886. <https://doi.org/10.1002/adma.201200420>
- Cooke, M. E., & Rosenzweig, D. H. (2021). The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. *APL Bioengineering*, 5(1), 1–20. <https://doi.org/10.1063/5.0031475>
- Costantini, M., Idaszek, J., Szöke, K., Jaroszewicz, J., Dentini, M., Barbetta, A., . . . Świąszkowski, W. (2016). 3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation. *Biofabrication*, 8(3), 35002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035002>
- Covarrubias, C., Agüero, A., Maureira, M., Morelli, E., Escobar, G., Cuadra, F., . . . Von Martens, A. (2019). In situ preparation and osteogenic properties of bionanocomposite scaffolds based on aliphatic polyurethane and bioactive glass nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 96, 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.085>
- Craparo, E. F., Drago, S. E., Mauro, N., Giammona, G., & Cavallaro, G. (2020). Design of New Polyaspartamide Copolymers for siRNA Delivery in Antiasthmatic Therapy. *Pharmaceutics*, Vol. 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020089>
- Crescenzi, V., Dentini, M., & Coviello, T. (1990). Solution and Gelling Properties of Microbial Polysaccharides of Industrial Interest : The Case of Gellan. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. (p. 277-284). Dordrecht: Springer.
- Crescenzi, V., Dentini, M., Coviello, T., & Rizzo, R. (1986). Comparative analysis of the behavior of Gellan gum (S-60) and welan gum (S-130) in dilute aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 149(2), 425-432.
- Critchley, S. E., & Kelly, D. J. (2017). Bioinks for bioprinting functional meniscus and articular cartilage. *Journal of 3D Printing in Medicine*, 1(4), 269-290.
- Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J. P., & Zhang, L. G. (2017). 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 6(1), 1601118.
- Cyphert, J. M., Trempus, C. S., & Garantziotis, S. (2015). Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *International Journal of Cell Biology*, 2015, 563818. <https://doi.org/10.1155/2015/563818>
- D'Arrigo, G., Di Meo, C., Gaucci, E., Chichiarelli, S., Coviello, T., Capitani, D., . . . Matricardi, P. (2012). Self-assembled gellan-based nanohydrogels as a tool for prednisolone delivery. *Soft Matter*, 8(45), 11557–11564. <https://doi.org/10.1039/c2sm26178b>
- D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., & Plow, E. F. (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(C), 246–250. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90096-E](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90096-E)
- Dababneh, A. B., & Ozbolat, I. T. (2014). Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 136(6), 061–016. <https://doi.org/10.1115/1.4028512>
- Dai, X., Liu, L., Ouyang, J., Li, X., Zhang, X., Lan, Q., & Xu, T. (2017). Coaxial 3D bioprinting of self-assembled multicellular heterogeneous tumor fibers. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01581-y>

- Daly, R., Harrington, T. S., Martin, G. D., & Hutchings, I. M. (2015). Inkjet printing for pharmaceuticals - A review of research and manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(2), 554–567. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.017>
- Dang, W., Yi, K., Ju, E., Jin, Y., Xu, Y., Wang, H., ... Li, M. (2021). 3D Printed Bioceramic Scaffolds as a Universal Therapeutic Platform for Synergistic Therapy of Osteosarcoma. *ACS Applied Materials & Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c00553>
- Datta, P., Barui, A., Wu, Y., Ozbolat, V., Moncal, K. K., & Ozbolat, I. T. (2018). Essential Steps in Bioprinting: From Pre- To Post-Bioprinting. *Biotechnol Adv.*, 36(5), 1481-1504.
- De Oliveira, A. C., Sabino, R. M., Souza, P. R., Muniz, E. C., Papat, K. C., Kipper, M. J., ... Martins, A. F. (2020). Chitosan/gellan gum ratio content into blends modulates the scaffolding capacity of hydrogels on bone mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering C*, 106, 110258. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110258>
- De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., & Peppas, N. A. (2018). Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regenerative Biomaterials*, 5(4), 197–211. <https://doi.org/10.1093/rb/rby013>
- Deng, Y., Ren, J., Chen, G., Li, G., Wu, X., Wang, G., ... Li, J. (2017). Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. *Scientific Reports*, 7(1), 2699. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02962-z>
- Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: a review of recent trends and advances. *Bioact. Mater.*, 3(2) 144-156. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>
- Derby, B. (2012). Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds. *Science*, 338(6109), 921-926.
- Devin, J. E., Attawia, M. A., & Laurencin, C. T. (1996). Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 7(8), 661–669. <https://doi.org/10.1163/156856296X00435>
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011(ii). <https://doi.org/10.1155/2011/290602>
- Diamantides, N., Dugopolski, C., Blahut, E., Kennedy, S., & Bonassar, L. J. (2019). High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks. *Biofabrication*, 11(4), 045016. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab3524>
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133–7155. <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>
- Do, A. -V., Khorsand, B., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2015). 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv. Healthcare Mater.*, 4(12), 1742-1762.
- Dong, R., Zhao, X., Guo, B., & Ma, P. X. (2016). Self-Healing Conductive Injectable Hydrogels with Antibacterial Activity as Cell Delivery Carrier for Cardiac Cell Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(27), 17138–17150. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04911>
- Douglas, T. E., Krawczyk, G., Pamula, E., Declercq, H. A., Schaubroeck, D., Bucko, M. M., . . . Dubruel, P. (2016). Generation of Composites for Bone Tissue-Engineering Applications Consisting of Gellan Gum Hydrogels Mineralized With Calcium and Magnesium Phosphate Phases by Enzymatic Means. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 10(11), 938-954.
- Douglas, T. E., Piwowarczyk, W., Pamula, E., Liskova, J., Schaubroeck, D., Leeuwenburgh, S. C., . . . Declercq, H. (2014). Injectable Self-Gelling Composites for Bone Tissue Engineering Based on Gellan Gum Hydrogel Enriched With Different Bioglasses. *Biomedical Materials*, 9(4), 045014.
- Downey, P. A., & Siegel, M. I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy*, 86(1), 77–91. <https://doi.org/10.1093/ptj/86.1.77>
- Du, H., Hamilton, P., Reilly, M., & Ravi, N. (2012). Injectable in Situ Physically and Chemically Crosslinkable Gellan Hydrogel. *Macromolecular Bioscience*, 12(7), 952-961.

- Duan, B., Kapetanovic, E., Hockaday, L. A., & Butcher, J. T. (2014). Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 1836–1846. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.005>
- Dzobo, K., Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Shipanga, H., Rowe, A., Dandara, C., ... Motaung, K. S. C. M. (2018). Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>
- Elahipanah, S., O'Brien, P. J., Rogozhnikov, D., & Yousaf, M. N. (2017). General Dialdehyde Click Chemistry for Amine Bioconjugation. *Bioconjugate Chemistry*, 28(5), 1422–1433. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00106>
- Elkhoury, K., Russell, C. S., Sanchez-Gonzalez, L., Mostafavi, A., Williams, T. J., Kahn, C., ... Tamayol, A. (2019). Soft-Nanoparticle Functionalization of Natural Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 8(18), 1–14. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900506>
- Fakhari, A., & Berkland, C. (2013). Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia*, 9(7), 7081–7092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.005>
- Fan, H., Demirci, U., & Chen, P. (2019). Emerging organoid models: Leaping forward in cancer research. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0832-4>
- Fang, X., Xie, J., Zhong, L., Li, J., Rong, D., Li, X., & Ouyang, J. (2016). Biomimetic gelatin methacrylamide hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(6), 1070–1080. <https://doi.org/10.1039/C5TB02251G>
- Fathi-Achachelouei, M., Knopf-Marques, H., Ribeiro da Silva, C. E., Barthès, J., Bat, E., Tezcaner, A., & Vrana, N. E. (2019). Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(May), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00113>
- Fedorovich, N. E., De Wijn, J. R., Verbout, A. J., Alblas, J., & Dhert, W. J. A. (2008). Three-dimensional fiber deposition of cell-laden, viable, patterned constructs for bone tissue printing. *Tissue Engineering - Part A*, 14(1), 127–133. <https://doi.org/10.1089/ten.a.2007.0158>
- Ferguson, E. L., Alshame, A. M. J., & Thomas, D. W. (2010). Evaluation of hyaluronic acid–protein conjugates for polymer masked–unmasked protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1), 95–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.029>
- Ferrari, M., Cirisano, F., & Morán, M. C. (2019). Mammalian Cell Behavior on Hydrophobic Substrates: Influence of Surface Properties. *Colloids and Interfaces*, 3(2), 48. <https://doi.org/10.3390/colloids3020048>
- Ferris, C. J., Gilmore, K. G., Wallace, G. G., & In het Panhuis, M. (2013a). Biofabrication: an overview of the approaches used for printing of living cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4243–4258.
- Ferris, C. J., Stevens, L. R., Gilmore, K. J., Mume, E., Greguric, I., Kirchmajer, D. M., ... In Het Panhuis, M. (2015). Peptide modification of purified gellan gum. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(6), 1106–1115. <https://doi.org/10.1039/c4tb01727g>
- Ferris, C. J., Gilmore, K. J., Wallace, G. G., & Panhuis, M. In Het. (2013b). Modified gellan gum hydrogels for tissue engineering applications. *Soft Matter*, 9(14), 3705–3711. <https://doi.org/10.1039/c3sm27389j>
- Fiorica, C., Pitarresi, G., Palumbo, F. S., Mauro, N., Federico, S., & Giammona, G. (2020). Production and physicochemical characterization of a new amine derivative of gellan gum and rheological study of derived hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116033. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116033>
- Fogelman, I., Van Der Wall, H., & Gnanasegaran, G. (2012). Radionuclide and hybrid bone imaging. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, 9783642024, 1–1046. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9>

- Francolini, I., Crisante, F., Martinelli, A., D'Ilario, L., & Piozzi, A. (2012). Synthesis of biomimetic segmented polyurethanes as antifouling biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 8(2), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.024>
- Gabriel, L. P., Rodrigues, A. A., Macedo, M., Jardini, A. L., & Maciel Filho, R. (2017). Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 72, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.057>
- Gabriel, L. P., Zavaglia, C. A. C., Jardini, A. L., Dias, C. G. B. T., & Filho, R. M. (2014). Isocyanates as precursors to biomedical polyurethanes. *Chemical Engineering Transactions*, 38(Mdi), 253–258. <https://doi.org/10.3303/CET1438043>
- Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., Khademhosseini, A. (2014). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnol. Bioeng.*, 111(3), 441-453. <https://doi.org/10.1002/bit.25160>
- Gantar, A., da Silva, L. P., Oliveira, J. M., Marques, A. P., Correlo, V. M., Novak, S., & Reis, R. L. (2014). Nanoparticulate Bioactive-Glass-Reinforced Gellan-Gum Hydrogels for Bone-Tissue Engineering. *Material Science and Engineering. C*, 43, 27-36.
- Gao, G., Schilling, A. F., Yonezawa, T., Wang, J., Dai, G. H., Cui, X. F. (2014). Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. J.*, 9(10), 1304-1311. <https://doi.org/10.1002/biot.201400305>
- Gao, Q., He, Y., Fu, J. Z., Liu, A., & Ma, L. (2015b). Coaxial Nozzle-Assisted 3D Bioprinting With Built-In Microchannels for Nutrients Delivery. *Biomaterials*, 61, 203-215.
- Gao, X., Guo, Y., Tian, Y., Li, S., Zhou, S., & Wang, Z. (2011). Synthesis and characterization of polyurethane/zinc borate nanocomposites. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1–3), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.11.037>
- García, M. C., Alfaro, M. C., Calero, N., & Muñoz, J. (2011). Influence of gellan gum concentration on the dynamic viscoelasticity and transient flow of fluid gels. *Biochemical Engineering Journal*, 55(2), 73-81.
- Ge, Q., Qi, H. J., & Dunn, M. L. (2013). Active materials by four-dimension printing. *Applied Physics Letters*, 103(13), 131901.
- Gentili, C., & Cancedda, R. (2009). Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Current Pharmaceutical Design*, 15(12), 1334–1348. <https://doi.org/10.2174/138161209787846739>
- Gibson, W., & Sanderson, G. R. (1997). Gellan gum. In Imeson A.P. (eds) *Thickening and Gelling Agents for Food*. (p. 119-143). Boston: Springer, US.
- Gillet, J. P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7), 452–458. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>
- Gong, Y., Wang, C., Lai, R. C., Su, K., Zhang, F., & Wang, D. A. (2009). An improved injectable polysaccharide hydrogel: Modified gellan gum for long-term cartilage regeneration in vitro. *Journal of Materials Chemistry*, 19(14), 1968–1977. <https://doi.org/10.1039/b818090c>
- Gopinathan, J., & Noh, I. (2017). Recent Trends in Bioinks for 3D Printing. *Biomaterials Research*, 22, 11.
- Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1987). Gelation of gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, 7(5), 371-393.
- Grasman, J. M., Zayas, M. J., Page, R. L., & Pins, G. D. (2015). Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomaterialia*, Vol. 25, pp. 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.038>
- Griffin, M., Castro, N., Bas, O., Saifzadeh, S., Butler, P., & Hutmacher, D. W. (2020). The Current Versatility of Polyurethane Three-Dimensional Printing for Biomedical Applications. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 26(3), 272–283. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0224>
- Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D. W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., ... Woodfield, T. B. F. (2019). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, Vol. 11. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52>

- Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen C. e Spence, D. M. (2014). Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3240-3253. <https://doi.org/10.1021/ac403397r>
- Grover, G. N., Lam, J., Nguyen, T. H., Segura, T., & Maynard, H. D. (2012). Biocompatible Hydrogels by Oxime Click Chemistry. *Biomacromolecules*, 13(10), 3013-3017. <https://doi.org/10.1021/bm301346e>
- Gu, B. K., Choi, D. J., Park, S. J., Kim, M. S., Kang, C. M., & Kim, C. H. (2016). 3-dimensional Bioprinting for Tissue Engineering Applications. *Biomater. Res.*, 20(1), 12.
- Gu, W., Wu, C., Chen, J., & Xiao, Y. (2013). Nanotechnology in the targeted drug delivery for bone diseases and bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2305-2317. <https://doi.org/10.2147/IJN.S44393>
- Gu, Y., Chen, X., Lee, J. H., Monteiro, D. A., Wang, H., & Lee, W. Y. (2012). Inkjet printed antibiotic- and calcium-eluting bioresorbable nanocomposite micropatterns for orthopedic implants. *Acta Biomaterialia*, 8(1), 424-431. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.006>
- Gu, Y., Zhang, L., Du, X., Fan, Z., Wang, L., Sun, W., Cheng, Y., Zhu, Y., Chen, C. (2018). Reversible physical crosslinking strategy with optimal temperature for 3D bioprinting of human chondrocyte-laden gelatin methacryloyl bioink. *J. Biomater. Appl.*, 33(5), 609-618. <https://doi.org/10.1177/0885328218805864>
- Guan, J., Sacks, M. S., Beckman, E. J., & Wagner, W. R. (2004). Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: Synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials*, 25(1), 85-96. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00476-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00476-9)
- Guelcher, S. A., Srinivasan, A., Dumas, J. E., Didier, J. E., McBride, S., & Hollinger, J. O. (2008). Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials*, 29(12), 1762-1775. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.046>
- Guillon, M. A., Mj Mary, P., Brugière, L., Marec-Bérard, P., Pacquement, H. D., Schmitt, C., ... Tabone, M.-D. P. (2011). Clinical characteristics and prognosis of osteosarcoma in young children: a retrospective series of 15 cases. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-407>
- Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: An overview. *Biomaterials Science*, 6(5), 915-946. <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>
- Gunning, A. P., & Morris, V. J. (1990). Light scattering studies of tetramethyl ammonium gellan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 12(6), 338-341.
- Gunning, A. P., Kirby, A. R., Ridout, M. J., Brownsey, G. J., & Morris, V. J. (1996). Investigation of Gellan Networks and Gels by Atomic Force Microscopy. *Macromolecules*, 29(21), 6791-6796.
- Guo, S. Z., Gosselin, F., Guerin, N., Lanouette, A. M., Heuzey, M. C., & Therriault, D. (2013). Solvent-cast three-dimensional printing of multifunctional microsystems. *Small*, 9(24), 4118-4122. <https://doi.org/10.1002/sml.201300975>
- Gupta, A., Main, B. J., Taylor, B. L., Gupta, M., Whitworth, C. A., Cady, C., Freeman J. W., El-Amin S. F. (2014). In vitro evaluation of three-dimensional single-walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 102(11) 4118-4126. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35088>
- Hafeez, S., Ooi, H. W., Morgan, F. L. C., Mota, C., Dettin, M., Blitterswijk, C. V., Moroni, L., Baker, M. B. (2018). Viscoelastic oxidized alginates with reversible imine type crosslinks: self-healing, injectable, and bioprintable hydrogels. *Gels*, 4(4), 85. <https://doi.org/10.3390/gels4040085>
- He, Y., Yang, F., Zhao, H., Gao, Q., Xia, B., & Fu, J. (2016). Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. <https://doi.org/10.1038/srep29977>

- Heinrich, M. A., Bansal, R., Lammers, T., Zhang, Y. S., Michel Schiffelers, R., & Prakash, J. (2019a). 3D-Bioprinted Mini-Brain: A Glioblastoma Model to Study Cellular Interactions and Therapeutics. *Advanced Materials*, 31(14), 1–9. <https://doi.org/10.1002/adma.201806590>
- Heinrich, M. A., Liu, W., Jimenez, A., Yang, J., Akpek, A., Liu, X., . . . Zhang, Y. S. (2019b). 3D Bioprinting: from Benches to Translational Applications. *Small*, 15(23), 1805510.
- Henry, S., McAllister, D. V., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated microneedles: A novel approach to transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(8), 922–925. <https://doi.org/10.1021/js980042+>
- Highley, C. B., Rodell, C. B., & Burdick, J. A. (2015). Direct 3D Printing of Shear-Thinning Hydrogels into Self-Healing Hydrogels. *Advanced Materials*, 27(34), 5075-5079.
- Hinton, T. J., Jallerat, Q., Palchesko, R. N., Park, J. H., Grodzicki, M. S., Shue, H. -J., . . . Feinberg, A. W. (2015). Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Science Advances*, 1(9), e1500758.
- Hoarau-Véhot, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 181. <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>
- Holmes, B., Zhu, W., Li, J., Lee, J. D., & Zhang, L. G. (2015). Development of Novel Three-Dimensional Printed Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *Tissue Eng., Part A*, 21(1-2), 403-415.
- Holten-Andersen, N., Harrington, M. J., Birkedal, H., Lee, B. P., Messersmith, P. B., Lee, K. Y. C., & Waite, J. H. (2011). pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2651 LP – 2655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015862108>
- Holzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L., & Ovsianikov, A. (2016). Bioink Properties Before, During and After 3D Bioprinting. *Biofabrication*, 8(3), 032002.
- Holzwarth, J. M., & Ma, P. X. (2011). Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 32, pp. 9622–9629. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.009>
- Horinaka, J. I., Kani, K., Hori, Y., & Maeda, S. (2004). Effect of pH on the conformation of gellan chains in aqueous systems. *Biophysical Chemistry*, 111(3), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.06.003>
- Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, Vol. 35, pp. 217–239. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.006>
- Hozumi, T., Kageyama, T., Ohta, S., Fukuda, J., & Ito, T. (2018). Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Cross-Linked by Schiff's Base Formation. *Biomacromolecules*, 19(2), 288–297. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01133>
- Huang, H., Qi, X., Chen, Y., & Wu, Z. (2019). Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(7), 990–999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.001>
- Huang, W., Wang, Y., Chen, Y., Zhao, Y., Zhang, Q., Zheng, X., . . . Zhang, L. (2016). Strong and Rapidly Self-Healing Hydrogels: Potential Hemostatic Materials. *Advanced Healthcare Materials*, 5(21), 2813–2822. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201600720>
- Huang, Y., Tang, J., Swanson, B. G., Cavinato, A. G., Lin, M., & Rasco, B. A. (2003). Near infrared spectroscopy: A new tool for studying physical and chemical properties of polysaccharide gels. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 281-288.
- Huerta-Ángeles, G., Nešporová, K., Ambrožová, G., Kubala, L., & Velebný, V. (2018). An Effective Translation: The Development of Hyaluronan-Based Medical Products From the Physicochemical, and Preclinical Aspects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 62. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00062>

- Hung, K.-C., Tseng, C.-S., Dai, L.-G., & Hsu, S. (2016). Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 83, 156–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.019>
- Hutmacher, D. W., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2004). Scaffold-based Tissue Engineering: Rationale for Computer-Aided Design and Solid Free-Form Fabrication Systems. *Trends Biotechnol.*, 22(7), 354-362.
- Jang, J., Park, J. Y., Gao, G., & Cho, D. -W. (2018). Biomaterials-based 3D Cell Printing for Next-Generation Therapeutics and Diagnostics. *Biomaterials*, 156, 88-106.
- Janik, H., & Marzec, M. (2015). A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 48, pp. 586–591. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.037>
- Jansson, P. -E., Lindberg, B., & Sandford, P. A. (1983). Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, 124(1), 135-139.
- Jay, A. J., Colquhoun, I. J., Ridout, M. J., Brownsey, G. J., Morris, V. J., Fialho, A. M., ... Sá-Correia, I. (1998). Analysis of structure and function of gellans with different substitution patterns. *Carbohydrate Polymers*, 35(3–4), 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00241-5)
- Jen, A. C., Wake, M., & Mikos, A. G. (1996). Review: Hydrogels for Cell Immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(4), 357-364.
- Jeong, B., Kim, S. W., Bae, Y. H. (2002). Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 37-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>
- Jia, J., Richards, D. J., Pollard, S., Tan, Y., Rodriguez, J., Visconti, R. P., Trusk, T. C., Yost, M. J., Yao, H., Markwald, R. R., Mei, Y. (2014). Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater.*, 10(10), 4323-4331. doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.034
- Johnson, R. L., & Fleet, J. C. (2013). Animal models of colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(1–2), 39–61. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6>
- Jones, J. R. (2015). Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, Vol. 23, pp. S53–S82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>
- Joseph, J., Patel, R. M., Wenham, A., & Smith, J. R. (2018). Biomedical applications of polyurethane materials and coatings. *Transactions of the Institute of Metal Finishing*, 96(3), 121–129. <https://doi.org/10.1080/00202967.2018.1450209>
- Jung, J. W., Lee, H., Hong, J. M., Park, J. H., Shim, J. H., Choi, T. H., & Cho, D. -W. (2015). A New Method of Fabricating a Blend Scaffold Using an Indirect Three-Dimensional Printing Technique. *Biofabrication*, 7(4), 045003.
- Jung, S. Y., Lee, S. J., Kim, H. Y., Park, H. S., Wang, Z., Kim, H. J., ... Kim, H. S. (2016). 3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: A pilot animal study. *Biofabrication*, 8(4). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/4/045015>
- Jungst, T., Smolan, W., Schacht, K., Scheibel, T., & Groll, J. (2016). Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chemical Reviews*, 116(3), 1496–1539. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00303>
- Kaigler, D., Silva, E., & Mooney, D. (2013). Guided Bone Regeneration Using Injectable Vascular Endothelial Growth Factor Delivery Gel. *Journal of Periodontology*, 84(2), 230-238.
- Kalia, J., & Raines, R. T. (2008). Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(39), 7523–7526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200802651>
- Kang, D., Zhang, H., Nitta, Y., Fang, Y., & Nishinari, K. (2015). In *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, eds. K. G. Ramawat and J. M. Me´rillon (p. 1627-1682). Switzerland: Springer International Publishing.
- Kang, Y., Datta, P., Shanmughapriya, S., & Ozbolat, I. T. (2020). 3D Bioprinting of Tumor Models for Cancer Research. *ACS Applied Bio Materials*, 3(9), 5552–5573. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00791>

- Kara, F., Aksoy, E. A., Yuksekdog, Z., Hasirci, N., & Aksoy, S. (2014). Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 112, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.019>
- Karimi, A. R., & Khodadadi, A. (2016). Mechanically Robust 3D Nanostructure Chitosan-Based Hydrogels with Autonomic Self-Healing Properties. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(40), 27254–27263. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10375>
- Katstra, W. E., Palazzolo, R. D., Rowe, C. W., Giritlioglu, B., Teung, P., & Cima, M. J. (2000). Oral dosage forms fabricated by Three Dimensional Printing(TM). *Journal of Controlled Release*, 66(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00225-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00225-4)
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(FEB), 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Kesti, M., Müller, M., Becher, J., Schnabelrauch, M., D'Este, M., Eglin, D., & Zenobi-Wong, M. (2015). A versatile bioink for three-dimensional printing of cellular scaffolds based on thermally and photo-triggered tandem gelation. *Acta Biomaterialia*, 11, 162–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.033>
- Khaled, S. A., Burley, J. C., Alexander, M. R., & Roberts, C. J. (2014). Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1–2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.021>
- Khalil, S., & Sun, W. (2009). Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. *Journal of Biomechanical Engineering*, 131(11), 111002.
- Khalil, S., Nam, J., & Sun, W. (2005). Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds. *Rapid Prototyping Journal*, 11(1), 9-17.
- Khan, F., & Tanaka, M. (2018). Designing smart biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
- Khan, M., Koivisto, J. T., Hukka, T. I., Hokka, M., & Kellomäki, M. (2018). Composite Hydrogels Using Bioinspired Approach with in Situ Fast Gelation and Self-Healing Ability as Future Injectable Biomaterial. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(14), 11950–11960. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01351>
- Khan, W., Farah, S., & Domb, A. J. (2012). Drug eluting stents: Developments and current status. *Journal of Controlled Release*, Vol. 161, pp. 703–712. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.02.010>
- Khoo, Z. X., Teoh, J. E., Liu, Y., Chua, C. K., Yang, S., An, J., . . . Yeong, W. Y. (2015). 3D printing of smart materials: A review on recent progresses in 4D printing. *Virtual and Physical Prototyping*, 10(3), 103-122.
- Kim, B. S., & Kim, B. K. (2005). Enhancement of hydrolytic stability and adhesion of waterborne polyurethanes. *Journal of Applied Polymer Science*, 97(5), 1961–1969. <https://doi.org/10.1002/app.21984>
- Kim, H. W., Knowles, J. C., & Kim, H. E. (2004a). Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(ϵ -caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 70(2), 240–249. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30038>
- Kim, H. W., Knowles, J. C., & Kim, H. E. (2004b). Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*, 25(7–8), 1279–1287. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.07.003>
- Kim, I. L., Mauck, R. L., & Burdick, J. A. (2011). Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*, 32(34), 8771–8782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.073>
- Kingsley, D. M., Roberge, C. L., Rudkouskaya, A., Faulkner, D. E., Barroso, M., Intes, X., & Corr, D. T. (2019). Laser-based 3D bioprinting for spatial and size control of tumor spheroids and embryoid bodies. *Acta Biomaterialia*, 95, 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.014>

- Kirchhof, S., Brandl, F. P., Hammer, N., & Goepferich, A. M. (2013). Investigation of the Diels–Alder reaction as a cross-linking mechanism for degradable poly(ethylene glycol) based hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(37), 4855–4864. <https://doi.org/10.1039/C3TB20831A>
- Kirchmajer, D. M., Gorkin, R., & In Het Panhuis, M. (2015). An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(20), 4105–4117. <https://doi.org/10.1039/c5tb00393h>
- Knowlton, S., Onal, S., Yu, C. H., Zhao, J. J., & Tasoglu, S. (2015). Bioprinting for Cancer Research. *Trends Biotechnol.*, 33(9), 504-513.
- Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z. T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. (1990). Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(3), 331–343. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240306>
- Krauland, A. H., Leitner, V. M., & Bernkop-Schnürch, A. (2003). Improvement in the in situ gelling properties of deacetylated gellan gum by the immobilization of thiol groups. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(6), 1234-1241.
- Kraybill, W. G., Harris, J., Spiro, I. J., Ettinger, D. S., DeLaney, T. F., Blum, R. H., ... Eisenberg, B. (2006). Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation therapy oncology group trial 9514. *Journal of Clinical Oncology*, 24(4), 619–625. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.5577>
- Kreimendahl, F., & Ko, M. (2017). Three-Dimensional Printing and Angiogenesis : 23(10), 604–615. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0234>
- Kucinska-Lipka, J., Gubanska, I., Janik, H., & Sienkiewicz, M. (2015). Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 46, pp. 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.027>
- Kumar, A., & Pillai, J. (2018). Implantable drug delivery systems: An overview. In *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications* (pp. 473–511). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00013-2>
- Kuo, M. S., Mort, A. J., & Dell, A. (1986). Identification and location of l-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum. *Carbohydrate Research*, 156(C), 173–187. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90109-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90109-5)
- Kyle, S., Jessop, Z. M., Al-Sabah, A., & Whitaker, I. S. (2017). ‘Printability’ of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. *Advanced Healthcare Materials*, 6(16).
- Langer, R. (2000). *Tissue Engineering. Molecular Therapy*, 1(1), 12–15. <https://doi.org/10.1006/mthe.1999.0003>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., & Filho, R. M. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnology Advances*, Vol. 30, pp. 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.019>
- Lee, J. -S., Kim, B. S., Seo, D., Park, J. H., & Cho, D. -W. (2017). Three-Dimensional Cell Printing of Large-Volume Tissues: Application to Ear Regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23(3), 136-145.
- Lee, J., Lee, S.H., Kim, B.S., Cho, Y.S., Park, Y. (2018) Development and Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Hybrid Bio-Ink for Tissue Regeneration. *Tissue Eng Regen Med*, 15(6), 761-769. doi:10.1007/s13770-018-0144-8
- Lee, V. K., & Dai, G. (2016). Printing of Three-Dimensional Tissue Analogs for Regenerative Medicine. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 115-131.

- Lee, V. K., Dai, G., Zou, H., & Yoo, S. S. (2015). Generation of 3-D glioblastoma-vascular niche using 3-D bioprinting. 2015 41st Annual Northeast Biomedical Engineering Conference, NEBEC 2015, 3–4. <https://doi.org/10.1109/NEBEC.2015.7117111>
- Lei, W., Fang, C., Zhou, X., Li, J., Yang, R., Zhang, Z., & Liu, D. (2017). Thermal properties of polyurethane elastomer with different flexible molecular chain based on para-phenylene diisocyanate. *Journal of Materials Science and Technology*, 33(11), 1424–1432. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2017.05.014>
- LeRoux, M. A., Guilak, F., & Setton, L. A. (1999). Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 47(1), 46-53.
- Levato, R., Visser, J., Planell, J. A., Engel, E., Malda, J., & Mateos-Timoneda, M. A. (2014). Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication*, 6(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035020>
- Li, J., Wu, C., Chub, P. K., & Gelinsky, M. (2020a). 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. *Materials Science & Engineering R*, 140, 100543.
- Li, L., Wang, N., Jin, X., Deng, R., Nie, S., Sun, L., ... Gong, C. (2014). Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. *Biomaterials*, 35(12), 3903–3917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.050>
- Li, M., Chen, J., Shi, M., Zhang, H., Ma, P. X., & Guo, B. (2019). Electroactive anti-oxidant polyurethane elastomers with shape memory property as non-adherent wound dressing to enhance wound healing. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121999. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121999>
- Li, Shangzhi, Pei, M., Wan, T., Yang, H., Gu, S., Tao, Y., ... Xiao, P. (2020b). Self-healing hyaluronic acid hydrogels based on dynamic Schiff base linkages as biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 250(May), 116922. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116922>
- Li, Shubin, Wang, L., Yu, X., Wang, C., & Wang, Z. (2018a). Synthesis and characterization of a novel double cross-linked hydrogel based on Diels-Alder click reaction and coordination bonding. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 299–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.031>
- Li, Shubin, Yi, J., Yu, X., Shi, H., Zhu, J., & Wang, L. (2018b). Preparation and Characterization of Acid Resistant Double Cross-Linked Hydrogel for Potential Biomedical Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(3), 872–883. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00818>
- Li, Y. C., Zhang, Y. S., Akpek, A., Shin, S. R., & Khademhosseini, A. (2016). 4D Bioprinting: The Next-Generation Technology for Biofabrication Enabled by Stimuli-Responsive Materials. *Biofabrication*, 9(1), 012001.
- Liaw, C. Y. & Guvendiren, M. (2017). Current and emerging applications of 3D printing in medicine. *Biofabrication*, 9(2):024102. doi: 10.1088/1758-5090/aa7279
- Ligon, S. C., Liska, R., Stampfl, J., Gurr, M., Mülhaupt, R. (2017). Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing. *Chem. Rev.*, 117(15), 10212-10290. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00074>
- Lim, W., Shin, S.Y., Cha, J.M., Bae, H. (2021). Optimization of polysaccharide hydrocolloid for the development of bioink with high printability/biocompatibility for coextrusion 3D bioprinting. *Polymers*, 13(11), 1773, <https://doi.org/10.3390/polym13111773>
- Lin, C. C., Fu, S. J., Lin, Y. C., Yang, I. K., & Gu, Y. (2014a). Chitosan-coated electrospun PLA fibers for rapid mineralization of calcium phosphate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.039>
- Lin, J., Wu, X., Zheng, C., Zhang, P., Huang, B., Guo, N., & Jin, L. (2014b). Synthesis and properties of epoxy-polyurethane/silica nanocomposites by a novel sol method and in-situ solution polymerization route. *Applied Surface Science*, 303, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.075>
- Liu, K., Liu, P. cheng, Liu, R., & Wu, X. (2015). Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Medical Science Monitor Basic Research*, 21, 15–20. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.893327>

- Liu, W., Heinrich, M. A., Zhou, Y., Akpek, A., Hu, N., Liu, X., . . . Zhang, Y. S. (2017). Extrusion Bioprinting of Shear-Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks. *Advanced Healthcare Materials*, 6(12).
- Liu, Y.-L., & Chuo, T.-W. (2013). Self-healing polymers based on thermally reversible Diels–Alder chemistry. *Polymer Chemistry*, 4(7), 2194–2205. <https://doi.org/10.1039/C2PY20957H>
- Liu, Y., & Hsu, S. H. (2018). Synthesis and biomedical applications of self-healing hydrogels. *Frontiers in Chemistry*, 6(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00449>
- Loh, X. J., Colin Sng, K. B., & Li, J. (2008). Synthesis and water-swelling of thermo-responsive poly(ester urethane)s containing poly(ϵ -caprolactone), poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol). *Biomaterials*, 29(22), 3185–3194. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.015>
- Loo, Y., Lakshmanan, A., Ni, M., Toh, L. L., Wang, S., & Hauser, C. A. (2015). Peptide Bioink: Self-Assembling Nanofibrous Scaffolds for Three-Dimensional Organotypic Cultures. *Nano Lett.*, 15(10), 6919-6925.
- Lorson, T., Ruopp, M., Nadernezhad, A., Eiber, J., Vogel, U., Jungst, T., & Lühmann, T. (2020). Sterilization Methods and Their Influence on Physicochemical Properties and Bioprinting of Alginate as a Bioink Component. *ACS Omega*, 5(12), 6481–6486. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04096>
- Lozano, R., Stevens, L., Thompson, B. C., Gilmore, K. J., Gorkin, R., Stewart, E. M., . . . Wallace, G. G. (2015). 3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates. *Biomaterials*, 67, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.022>
- Lü, S., Gao, C., Xu, X., Bai, X., Duan, H., Gao, N., . . . Liu, M. (2015). Injectable and Self-Healing Carbohydrate-Based Hydrogel for Cell Encapsulation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(23), 13029–13037. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03143>
- Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I., & Juergens, H. (2014). Osteosarcoma treatment - Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treatment Reviews*, 40(4), 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>
- Luo, S. G., Tan, H. M., Zhang, J. G., Wu, Y. J., Pei, F. K., & Meng, X. H. (1997). Catalytic mechanisms of triphenyl bismuth, dibutyltin dilaurate, and their combination in polyurethane-forming reaction. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(6), 1217–1225. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4628\(19970808\)65:6<1217::aid-app17>3.3.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19970808)65:6<1217::aid-app17>3.3.co;2-1)
- Ma, X., & Zhao, Y. (2015). Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions. *Chemical Reviews*, 115(15), 7794–7839. <https://doi.org/10.1021/cr500392w>
- Maisonneuve, Benoît G.C., Roux, D. C. D., Thorn, P., & Cooper-White, J. J. (2013). Effects of cell density and biomacromolecule addition on the flow behavior of concentrated mesenchymal cell suspensions. *Biomacromolecules*, 14(12), 4388–4397. <https://doi.org/10.1021/bm401335g>
- Maisonneuve, Benoît G.C., Roux, D. C. D., Thorn, P., & Cooper-White, J. J. (2015). Effects of synthetic biomacromolecule addition on the flow behavior of concentrated mesenchymal cell suspensions. *Biomacromolecules*, 16(1), 275–283. <https://doi.org/10.1021/bm501481y>
- Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., . . . Hutmacher, D. W. (2013). 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *25(36)*, 5011–5028. <https://doi.org/10.1002/adma.201302042>
- Manda-Guiba, G. M., Oliveira, M. B., Mano, J. F., Marques, A. P., Oliveira, J. M., Correlo, V. M., & Reis, R. L. (2012). Gellan Gum-Hydroxyapatite Composite Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 6(2), 15.
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. -H. (2016). 3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues. *Biotechnology Advances*, 34(4), 422-434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Mao, R., Tang, J., & Swanson, B. G. (2000). Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 331-338.
- Mao, R., Tang, J., & Swanson, B. G. (2001). Water holding capacity and microstructure of gellan gels. *Carbohydrate Polymers*, 46(4), 365-371.

- Marie, P. (1992). Physiology of bone tissue. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 7(6), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(05\)80182-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(05)80182-6)
- Marieb, E., & Hoehn, K. (2010). *Human Anatomy & Physiology*, 8th ed. San Francisco: Pearson International Edition.
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Avila, H. M., Hagg, D., Gatenholm, P. (2015). 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 16(5), 1489-1496. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00188>
- Martínez-Sanz, E., Ossipov, D. A., Hilborn, J., Larsson, S., Jonsson, K. B., & Varghese, O. P. (2011). Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *Journal of Controlled Release*, 152(2), 232–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.003>
- Marzec, M., Kucińska-Lipka, J., Kalaszczynska, I., & Janik, H. (2017). Development of polyurethanes for bone repair. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 80, pp. 736–747. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.047>
- Matsukawa, S., & Watanabe, T. (2007). Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low- and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurements. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1355-1361.
- Mauck, R. L., Wang, C. C. B., Oswald, E. S., Ateshian, G. A., & Hung, C. T. (2003). The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(12), 879–890. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2003.08.006>
- Melchels, F. P., Dhert, W. J., Hutmacher, D. W., & Malda, J. (2014). Development and characterisation of a new bioink for additive tissue manufacturing. *Journal of Material Chemistry. B*, 2(16), 2282-2289.
- Melchels, F. P., Domingos, M. A., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J., & Hutmacher, D. W. (2012). Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*, 37(8), 1079-1104.
- Mi, H.-Y., Xin, J., Salick, M. R., Cordie, T. M., Peng, Xiang-Fang, ... Turng, S. (2014). Morphology, mechanical properties, and mineralization of rigid thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue applications: effects of fabrication approaches and hydroxyapatite size. *Journal of Materials Science*, 49, 2324–2337. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7931-3>
- Mi, H. Y., Jing, X., Yilmaz, G., Hagerty, B. S., Enriquez, E., & Turng, L. S. (2018). In situ synthesis of polyurethane scaffolds with tunable properties by controlled crosslinking of tri-block copolymer and polycaprolactone triol for tissue regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 348, 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.198>
- Mi, H. Y., Salick, M. R., Jing, X., Jacques, B. R., Crone, W. C., Peng, X. F., & Turng, L. S. (2013). Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *Materials Science and Engineering C*, 33(8), 4767–4776. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.037>
- Mignon, A., Graulus, G.-J., Snoeck, D., Martins, J., De Belie, N., Dubruel, P., & Van Vlierberghe, S. (2015). pH-sensitive superabsorbent polymers: a potential candidate material for self-healing concrete. *Journal of Materials Science*, 50(2), 970–979. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8657-6>
- Milas, M., Shi, X., & Rinaudo, M. (1990). On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, 30(3-4), 451-464.
- Miyamoto, K., Tsuji, K., Nakamura, T., Tokita, M., & Komai, T. (1996). Preparation of carboxymethyl-gellan. *Carbohydrate Polymers*, 30(2-3), 161-164.
- Miyata, K., Oba, M., Nakanishi, M., Fukushima, S., Yamasaki, Y., Koyama, H., Nishiyama, N., Kataoka, K. (2008). Polyplexes from Poly(aspartamide) Bearing 1,2-Diaminoethane Side Chains Induce pH-Selective, Endosomal Membrane Destabilization with Amplified Transfection and Negligible Cytotoxicity. *J. AM. CHEM. SOC.* 130(48), 16287-16294. <https://doi.org/10.1021/ja804561g>
- Miyoshi, E., Takaya, T., & Nishinari, K. (1996). Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 30(2-3), 109-119.

- Mody, V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>
- Mohan, N., Mohanan, P. V., Sabareeswaran, A., & Nair, P. (2017). Chitosan-hyaluronic acid hydrogel for cartilage repair. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1936–1945. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.142>
- Møller, P. C. F., Mewis, J., & Bonn, D. (2006). Yield stress and thixotropy: On the difficulty of measuring yield stresses in practice. *Soft Matter*, 2(4), 274–283. <https://doi.org/10.1039/b517840a>
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Trachtenberg, A. J., Hochberg, F. H., Skog, J., & Kuo, W. P. (2012). Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Frontiers in Physiology*, 3, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00162>
- Mondal, S., & Martin, D. (2012). Hydrolytic degradation of segmented polyurethane copolymers for biomedical applications. *Polymer Degradation and Stability*, 97(8), 1553–1561. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.04.008>
- Mondschein, R. J., Kanitkar, A., Williams, C. B., Verbridge, S. S., & Long, T. E. (2017). Polymer structure-property requirements for stereolithographic 3D printing of soft tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, Vol. 140, pp. 170–188. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.005>
- Moradi, M., Moghadam, M. K., Shamsborhan, M., Bodaghi, M., & Falavandi, H. (2020). Post-processing of FDM 3d-printed polylactic acid parts by laser beam cutting. *Polymers*, 12(3), 550. <https://doi.org/10.3390/polym12030550>
- Morris, E. R., Gothard, M. G., Hember, M. W., Manning, C. E., & Robinson, G. (1996). Conformational and rheological transitions of welan, rhamosan and acylated gellan. *Carbohydrate Polymers*, 30(2-3), 165-175.
- Morris, E. R., Nishinari, K., & Rinaudo, M. (2012). Gelation of gellan – A review. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 373-411.
- Morris, E. R., Rees, D. A., & Robinson, G. (1980). Cation-specific Aggregation of Carrageenan Helices: Domain Model of Polymer Gel Structure. *J. Mol. Biol.*, 138(2), 349-362.
- Moulton, S. E., & Wallace, G. G. (2014). 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 193, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.005>
- Mouser, V H M, Abbadessa, A., Levato, R., Hennink, W. E., Vermonden, T., Gawlitta, D., & Malda, J. (2017). Development of a thermosensitive HAMA-containing bio-ink for the fabrication of composite cartilage repair constructs. *Biofabrication*, 9(1), 15026. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa6265>
- Mouser, Vivian H M, Levato, R., Mensinga, A., Dhert, W. J. A., Gawlitta, D., & Malda, J. (2020). Bio-ink development for three-dimensional bioprinting of hetero-cellular cartilage constructs. *Connective Tissue Research*, 61(2), 137–151. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1553960>
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
- Mukherjee, S., Hill, M. R., & Sumerlin, B. S. (2015). Self-healing hydrogels containing reversible oxime crosslinks. *Soft Matter*, 11(30), 6152–6161. <https://doi.org/10.1039/C5SM00865D>
- Müller, M., Becher, J., Schnabelrauch, M., & Zenobi-wong, M. (2015). Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/3/035006>
- Mulvaney, P. (1996). Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* 1996, 12(3), 788–800. <https://doi.org/10.1021/la9502711>
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Murphy, S. V., Skardal, A., & Atala, A. (2013). Evaluation of Hydrogels for Bio-Printing Applications. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 101(1), 272-284.

- Naghieh, S., Karamooz-Ravari, M. R., Sarker, M. D., Karki, E., & Chen, X. (2018). Influence of crosslinking on the mechanical behavior of 3D printed alginate scaffolds: Experimental and numerical approaches. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 80, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.034>
- Nair, K., Gandhi, M., Khalil, S., Yan, K. C., Marcolongo, M., Barbee, K., & Sun, W. (2009). Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnology Journal*, 4(8), 1168–1177.
- Nair, S., Remya, N. S., Remya, S., & Nair, P. D. (2011). A biodegradable in situ injectable hydrogel based on chitosan and oxidized hyaluronic acid for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 838–844. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.004>
- Nakajima, K., Ikehara, T., & Nishi, T. (1996). Observation of gellan gum by scanning tunneling microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 30(2-3), 77–81.
- Ng, W. S., Lee, C. S., Chuah, C. H., & Cheng, S. F. (2017). Preparation and modification of water-blow porous biodegradable polyurethane foams with palm oil-based polyester polyol. *Industrial Crops and Products*, 97, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.066>
- Nguyen, Q. D., & Boger, D. V. (1992). Measuring the Flow Properties of Yield Stress Fluids. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 24(1), 47–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.fl.24.010192.000403>
- Nguyen, T.-P., & Lee, B.-T. (2011). Fabrication of oxidized alginate-gelatin-BCP hydrogels and evaluation of the microstructure, material properties and biocompatibility for bone tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*, 27(3), 311–321. <https://doi.org/10.1177/0885328211404265>
- Ning, L., Sun, H., Lelong, T., Guilloteau, R., Zhu, N., Schreyer, D. J., & Chen, X. (2018). 3D bioprinting of scaffolds with living Schwann cells for potential nerve tissue engineering applications. *Biofabrication*, 10(3), 35014. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aacd30>
- Nitta, Y., Takahashi, R., & Nishinari, K. (2010). Viscoelasticity and phase separation of aqueous Na-type gellan solution. *Biomacromolecules*, 11(1), 187–191. <https://doi.org/10.1021/bm901063k>
- Noda, S. F., Nakauma, M., Asai, I., Takahashi, R., Al-Assaf, S., Ikeda, S., . . . Phillips, G. O. (2008). Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems. 1. Gellan gum with various acyl contents in the presence and absence of potassium. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1148–1159.
- Noh, I., Kim, N., Tran, H. N., Lee, J., & Lee, C. (2019). 3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering. *Biomaterials Research*, 23(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0152-8>
- Novac, O., Lisa, G., Barbu, E., Alhaique, F., & Popa, M. I. (2013). Synthesis and Characterization of N-(2-aminoethyl)-2-acetamidyl Gellan Gum With Potential Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 174–177.
- O'Brien, C. M., Holmes, B., Faucett, S., & Zhang, L. G. (2015). Three-dimensional Printing of Nanomaterial Scaffolds for Complex Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 21(1), 103–114.
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, Vol. 14, pp. 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- O'Connell, C. D., Di Bella, C., Thompson, F., Augustine, C., Beirne, S., Cornock, R., . . . Wallace, G. G. (2016). Development of the Biopen: a handheld device for surgical printing of adipose stem cells at a chondral wound site. *Biofabrication*, 8(1), 15019. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/015019>
- Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J. J., & Atala, A. (1999). De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 17(2), 149–155. <https://doi.org/10.1038/6146>
- Ogawa, E. (1997). Conformational properties of polysaccharide gellan gum in aqueous solutions. *Recent Res. Dev. Macromol. Res.*, 2, 81–94.
- Ogawa, E., Matsuzawa, H., & Iwahashi, M. (2002). Conformational transition of gellan gum of sodium, lithium, and potassium types in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 1–9.

- Ogawa, E., Takahashi, R., Yajima, H., & Nishinari, K. (2006). Effects of molar mass on the coil to helix transition of sodium-type gellan gums in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3 SPEC. ISS.), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.016>
- Oh, S., Oh, N., Appleford, M., & Ong, J. L. (2006). Bioceramics for Tissue Engineering Applications. A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2(2), 49–56. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2006.49.56>
- Okay, O. (2010). General Properties of Hydrogels BT - Hydrogel Sensors and Actuators: Engineering and Technology. In G. Gerlach & K.-F. Arndt (Eds.), *General Properties of Hydrogels* (pp. 1–14). https://doi.org/10.1007/978-3-540-75645-3_1
- Oliveira, J. T., Martins, L., Picciochi, R., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Neves, N. M., . . . Reis, R. L. (2010a). Gellan Gum: A New Biomaterial for Cartilage Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 93(3), 852-863.
- Oliveira, J. T., Santos, T. C., Martins, L., Picciochi, R., Marques, A. P., Castro, A. G., . . . Reis, R. L. (2010b). Gellan gum injectable hydrogels for cartilage tissue engineering applications: in vitro studies and preliminary in vivo evaluation. *Tissue Engineering. Part A*, 16(1), 343-353.
- Oliveira, J. T., Santos, T. C., Martins, L., Silva, M. A., Marques, A. P., Castro, A. G., . . . Reis, R. L. (2009). Performance of New Gellan Gum Hydrogels Combined With Human Articular Chondrocytes for Cartilage Regeneration When Subcutaneously Implanted in Nude Mice. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 3(7), 493-500.
- Ooi, H. W., Mota, C., Tessa Ten Cate, A., Calore, A., Moroni, L., & Baker, M. B. (2018). Thiol-Ene Alginate Hydrogels as Versatile Bioinks for Bioprinting. *Biomacromolecules*, 19(8), 3390-3400.
- Osmalek, T., Froelich, A., & Tasarek, S. (2014). Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 466 (1-2), 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.038>
- Ossipov, D. A., Yang, X., Varghese, O., Kotalaa S., and Hilborn, J. (2010). Modular Approach to Functional Hyaluronic Acid Hydrogels Synthesis Using Orthogonal Chemoselective Reactions. *Chemical Communications*, 46, 8368-8370. <https://doi.org/10.1039/C0CC03055D>
- Ouyang, L., Highley, C. B., Rodell, C. B., Sun, W., & Burdick, J. A. (2016a). 3D Printing of Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels with Secondary Cross-Linking. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(10). <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00158>
- Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016b). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3), 035020.
- Overstreet, D. J., Dutta, D., Stabenfeldt, S. E., & Vernon, B. L. (2012). Injectable hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50(13), 881–903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/polb.23081>
- Ozbolat, I. T. (2015a). Bioprinting Scale-Up Tissue and Organ Constructs for Transplantation. *Trends Biotechnology*, 33(7), 395-400.
- Ozbolat, I. T. (2015b). Scaffold-Based or Scaffold-Free Bioprinting: Competing or Complementing Approaches? *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 6(2), 024701. <https://doi.org/10.1115/1.4030414>
- Ozbolat, I. T., Chen, H., & Yu, Y. (2014). Development of 'Multi-arm Bioprinter' for hybrid biofabrication of tissue engineering constructs. *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing*, 30(3), 295-304.
- Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76, 321–343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>
- Palumbo, F. S., Federico, S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2020). Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115430>

- Palumbo, F. S., Federico, S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2021). Synthesis and characterization of redox sensitive polyurethanes based on L-Glutathione oxidized and poly(ether ester) triblock copolymers. *Reactive and Functional Polymers*.
- Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Mandracchia, D., Tripodo, G., & Giammona, G. (2006). New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 379-385.
- Pandit, A. H., Mazumdar, N., & Ahmad, S. (2019). Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 853–869. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.014>
- Panwar, A., & Tan, L. P. (2016). Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting. *Molecules*, 21(6), pii: E685. <https://doi.org/10.3390/molecules21060685>
- Park, C. W., Cho, S. M., & Kim, B. K. (2006). Synthesis and properties of thermosensitive polyurethane-b-poly(N-isopropyl acrylamide). *Reactive and Functional Polymers*, 66(6), 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2005.10.025>
- Park, H., Temenoff, J. S., Tabata, Y., Caplan, A. I., & Mikos, A. G. (2007). Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 28(21), 3217–3227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.030>
- Park, J., Wrzesinski, S. H., Stern, E., Look, M., Criscione, J., Ragheb, R., ... Fahmy, T. M. (2012). Combination delivery of TGF-beta inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nature Materials*. <https://doi.org/10.1038/NMAT3355>
- Park, J. Y., Choi, J. -C., Shim, J. -H., Lee, J. -S., Park, H., Kim, S. W., . . . Cho, D. -W. (2014a). A Comparative Study on Collagen Type I and Hyaluronic Acid Dependent Cell Behavior for Osteochondral Tissue Bioprinting. *Biofabrication*, 6(3), 035004.
- Park, J. Y., Gao, G., Jang, J., & Cho, D. -W. (2016b). 3D printed structures for delivery of biomolecules and cells: tissue repair and regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(47), 7521-7539.
- Park, K. M., & Park, K. D. (2018). In Situ Cross-Linkable Hydrogels as a Dynamic Matrix for Tissue Regenerative Medicine. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 15, pp. 547–557. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0155-5>
- Park, S. -H., Jung, C. S., & Min, B. -H. (2016c). Advances in three-dimensional bioprinting for hard tissue engineering. *Tissue Eng. Regen. Med.*, 13(6), 622-635.
- Pati, F., Gantelius, J., & Svahn, H. A. (2016). 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 55(15), 4650-4665.
- Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2011). Chemical modification of alginates in organic solvent systems. *Biomacromolecules*, 12(11), 4095-4103.
- Peak, C. W., Stein, J., Gold, K. A., & Gaharwar, A. K. (2018). Nanoengineered Colloidal Inks for 3D Bioprinting. *Langmuir*, 34(3), 917-925.
- Pehlivan, S. B., Yavuz, B., Çalamak, S., Ulubayram, K., Kaffashi, A., Vural, I., ... Ünlü, N. (2015). Preparation and in vitro/in vivo evaluation of cyclosporin A-loaded nanodecorated ocular implants for subconjunctival application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(5), 1709–1720. <https://doi.org/10.1002/jps.24385>
- Pereira, D. R., Canadas, R. F., Silva-Correia, J., Marques, A. P., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2014). Gellan gum-based Hydrogel Bilayered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering. *Key Engineering Materials*, 587, 255-260.
- Petta, D., D'Amora, U., Ambrosio, L., Grijpma, D. W., Eglin, D., & D'Este, M. (2020). Hyaluronic acid as a bioink for extrusion-based 3D printing. *Biofabrication*, Vol. 12, p. 032001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab8752>
- Picci, P. (2007). Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 6. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-6>

- Ping, P., Wang, W., Chen, X., Jing, X. (2007). The Influence of Hard-Segments on Two-Phase Structure and Shape Memory Properties of PCL-Based Segmented Polyurethanes. *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics*, 45(5), 557-570. <https://doi.org/10.1002/polb.20974>
- Poldervaart, M. T., Goversen, B., de Ruijter, M., Abbadessa, A., Melchels, F. P. W., Öner, F. C., ... Alblas, J. (2017). 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity. *PLOS ONE*, 12(6), e0177628.
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
- Prendergast, M. E., Solorzano, R. D., & Cabrera, D. (2016). Bioinks for biofabrication: current state and future perspectives. *Journal of 3D Printing in Medicine*, 1(1).
- Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 155(2), 193–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.007>
- Przybytek, A., Gubańska, I., Kucińska-Lipka, J., & Janik, H. (2018). Polyurethanes as a potential medical--grade filament for use in fused deposition modeling 3d printers – A brief review. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 26(6), 120–125. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.5168>
- Purcell, B. P., Lobb, D., Charati, M. B., Dorsey, S. M., Wade, R. J., Zellars, K. N., ... Burdick, J. A. (2014). Injectable and bioresponsive hydrogels for on-demand matrix metalloproteinase inhibition. *Nature Materials*, 13(6), 653–661. <https://doi.org/10.1038/nmat3922>
- Qu, J., Zhao, X., Liang, Y., Zhang, T., Ma, P. X., & Guo, B. (2018). Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials*, 183, 185–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.044>
- Qu, J., Zhao, X., Ma, P. X., & Guo, B. (2017). pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy. *Acta Biomaterialia*, 58, 168–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.001>
- Quinn, F. X., Hatakeyama, T., Yoshida, H., Takahashi, M., & Hatakeyama, H. (1993). The conformational properties of Gellan gum hydrogels. *Polymer Gels and Networks*, 1(2), 93-114.
- Ragothaman, M., Palanisamy, T., & Kalirajan, C. (2014). Collagen-poly(dialdehyde) guar gum based porous 3D scaffolds immobilized with growth factor for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 114, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.045>
- Rahmani Del Bahkshayesh, A., Annabi, N., Khalilov, R., Akbarzadeh, A., Samiei, M., Alizadeh, E., ... Montaseri, A. (2018). Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, Vol. 46, pp. 691–705. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1349778>
- Ramesh, S., Harrysson, O. L. A., Rao, P. K., Tamayol, A., Cormier, D. R., Zhang, Y., & Rivero, I. V. (2021). Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities. *Bioprinting*, 21(November 2020), e00116. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00116>
- Ramesh, S., Lungaro, L., Tsikrictsis, D., Weflen, E., Rivero, I. V., & Elfick, A. P. D. (2018). Fabrication and evaluation of poly(lactic acid), chitosan, and tricalcium phosphate biocomposites for guided bone regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(39), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.46692>
- Ren, X., Wang, F., Chen, C., Gong, X., Yin, L., & Yang, L. (2016). Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 301. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1130-8>
- Reyes, R., Delgado, A., Solis, R., Sanchez, E., Hernandez, A., Roman, J. S., & Evora, C. (2014). Cartilage repair by local delivery of transforming growth factor-β1 or bone morphogenetic protein-2 from a novel, segmented polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) bilayered scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(4), 1110–1120. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34769>

- Rider, P., Kačarević, Ž. P., Alkildani, S., Retnasingh, S., & Barbeck, M. (2018). Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, 9, 2041731418802090. <https://doi.org/10.1177/2041731418802090>
- Rinaudo, M. (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 433–440. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00041-8)
- Rinaudo, M. (2004). Role of substituents on the properties of some polysaccharides. *Biomacromolecules*, 5(4), 1155–1165.
- Ritter, J., & Bielack, S. S. (2010). Osteosarcoma. *Annals of Oncology*, 21(SUPPL. 7), 320–325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq276>
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(4), 853–858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Rodell, C. B., Mealy, J. E., & Burdick, J. A. (2015). Supramolecular Guest–Host Interactions for the Preparation of Biomedical Materials. *Bioconjugate Chemistry*, 26(12), 2279–2289. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00483>
- Rowe, C. W., Katstra, W. E., Palazzolo, R. D., Giritlioglu, B., Teung, P., & Cima, M. J. (2000). Multimechanism oral dosage forms fabricated by three dimensional printing(TM). *Journal of Controlled Release*, 66(1), 11–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00224-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00224-2)
- Rozario, T., & DeSimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology*, 341(1), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
- Ruiz, A., Rathnam, K. R., & Masters, K. S. (2014). Effect of hyaluronic acid incorporation method on the stability and biological properties of polyurethane-hyaluronic acid biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(2), 487–498. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5092-1>
- Ruoslahti, E. (1989). Proteoglycans in Cell Regulation. *J. Biol. Chem.*, 264(23), 13369–13372.
- Rutz, A. L., Hyland, K. E., Jakus, A. E., Burghardt, W. R., Shah, R. N. (2015). A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels. *Adv. Mater.*, 27(9), 1607–1614. <https://doi.org/10.1002/adma.201405076>
- Russell, C. S., Mostafavi, A., Quint, J. P., Panayi, A. C., Baldino, K., Williams, T. J., ... Tamayol, A. (2020). In Situ Printing of Adhesive Hydrogel Scaffolds for the Treatment of Skeletal Muscle Injuries. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1568–1579. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01176>
- Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>
- Saiz, E., Zimmermann, E. A., Lee, J. S., Wegst, U. G. K., & Tomsia, A. P. (2013). Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dental Materials*, 29(1), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.08.001>
- Sánchez-Salazar, M. G., Álvarez, M. M., & Trujillo-de Santiago, G. (2021). Advances in 3D bioprinting for the biofabrication of tumor models. *Bioprinting*, 21(June 2020), e00120. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00120>
- Sandler, N., Salmela, I., Fallarero, A., Rosling, A., Khajeheian, M., Kolakovic, R., ... Vuorela, P. (2014). Towards fabrication of 3D printed medical devices to prevent biofilm formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 459(1–2), 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.001>
- Sanyasi, S., Majhi, R., Kumar, S., Goswami, L., (2016). Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells. *Sci Rep* 6, 24929. <https://doi.org/10.1038/srep24929>.
- Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 469–489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>

- Schuurman, W., Khristov, V., Pot, M. W., Van Weeren, P. R., Dhert, W. J. A., & Malda, J. (2011). Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties. *Biofabrication*, 3(2), 021001. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/2/021001>
- Schwartz, R., Malpica, M., Thompson, G. L., & Miri, A. K. (2020). Cell encapsulation in gelatin bioink impairs 3D bioprinting resolution. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 103, 103524. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103524>
- Sears, N. A., Seshadri, D. R., Dhavalikar, P. S., & Cosgriff-Hernandez, E. (2016). A Review of Three-Dimensional Printing in Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 22, 298–310. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0464>
- Seol, Y. J., Kang, T. Y., & Cho, D. W. (2012). Solid freeform fabrication technology applied to tissue engineering with various biomaterials. *Soft Matter*, 8, 1730-1735.
- Shi, P., Laude, A., Yeong, W. Y. (2017). Investigation of cell viability and morphology in 3D bioprinted alginate constructs with tunable stiffness. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 105(4), 1009-1018. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35971>
- Shim, J.-H., Jang, K.-M., Hahn, S. K., Park, J. Y., Jung, H., Oh, K., ... Cho, D.-W. (2016). Three-dimensional bioprinting of multilayered constructs containing human mesenchymal stromal cells for osteochondral tissue regeneration in the rabbit knee joint. *Biofabrication*, 8(1), 14102. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/014102>
- Shin, J., & Kang, H.-W. (2018). The Development of Gelatin-Based Bio-Ink for Use in 3D Hybrid Bioprinting. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 19, 767–771. <https://doi.org/10.1007/s12541-018-0092-1>
- Siemann, U. (2005). Solvent cast technology - A versatile tool for thin film production. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 130, 1–14. <https://doi.org/10.1007/b107336>
- Silva, N. A., Cooke, M. J., Tam, R. Y., Sousa, N., Salgado, A. J., Reis, R. L., & Shoichet, M. S. (2012). The effects of peptide modified gellan gum and olfactory ensheathing glia cells on neural stem/progenitor cell fate. *Biomaterials*, 33(27), 6345–6354. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.050>
- Silva-Correia, J., Gloria, A., Oliveira, M. B., Mano, J. F., Oliveira, J. M., Ambrosio, L., & Reis, R. L. (2013a). Rheological and mechanical properties of acellular and cell-laden methacrylated gellan gum hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101(12), 3438–3446. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34650>
- Silva-Correia, J., Miranda-Gonçalves, V., Salgado, A. J., Sousa, N., Oliveira, J. M., Reis, R. M., & Reis, R. L. (2012). Angiogenic potential of gellan-gum-based hydrogels for application in nucleus pulposus regeneration: In vivo study. *Tissue Engineering - Part A*, 18(11–12), 1203–1212. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0632>
- Silva-Correia, J., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2016). Gellan Gum-based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. In *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*. First Edition. Edited by Nuno M. Neves and Rui L. Reis. (p. 320-336). John Wiley & Sons.
- Silva-Correia, J., Oliveira, J. M., Caridade, S. G., Oliveira, J. T., Sousa, R. A., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2011). Gellan Gum-Based Hydrogels for Intervertebral Disc Tissue-Engineering Applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 5(6), 97-107.
- Silva-Correia, J., Zavan, B., Vindigni, V., Silva, T. H., Oliveira, J. M., Abatangelo, G., & Reis, R. L. (2013c). Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: In vitro and in vivo study. *Advanced Healthcare Materials*, 2(4), 568–575. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200256>
- Singh, B. N., & Kim, K. H. (2005). Effects of Divalent Cations on Drug Encapsulation Efficiency of Deacylated Gellan Gum. *J. Microencapsul.*, 22(7), 761-771.
- Singh, D., Singh, S., Sahu, J., Srivastava, S., & Singh, M. R. (2016). Ceramic nanoparticles: Recompense, cellular uptake and toxicity concerns. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, Vol. 44, pp. 401–409. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955106>

- Skardal, A., Atala, A. (2014). Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting. *Ann. Biomed. Eng.*, 43, 730-746. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1207-1>
- Skardal, A., Mack, D., Kapetanovic, E., Atala, A., Jackson, J. D., Yoo, J., & Soker, S. (2012). Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(11), 792–802. <https://doi.org/https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0088>
- Skardal, A., Zhang, J., McCoard, L., Xu, X., Oottamasathien, S., & Prestwich, G. D. (2010a). Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Engineering - Part A*, 16(8), 2675–2685. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0798>
- Skardal, A., Zhang, J., & Prestwich, G. D. (2010b). Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. *Biomaterials*, 31(24), 6173–6181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.045>
- Sliwinska, M. A., Mosieniak, G., Wolanin, K., Babik, A., Piwocka, K., Magalska, A., ... Sikora, E. (2009). Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(1–2), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.04.011>
- Smith, A. M., Shelton, R. M., Perrie, Y., & Harris, J. J. (2007). An Initial Evaluation of Gellan Gum as a Material for Tissue Engineering Applications. *J. Biomater. Appl.*, 22(3), 241-254.
- Song, S.-J., Choi, J., Park, Y.-D., Lee, J.-J., Hong, S. Y., & Sun, K. (2010). A Three-Dimensional Bioprinting System for Use With a Hydrogel-Based Biomaterial and Printing Parameter Characterization. *Artificial Organs*, 34(11), 1044–1048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2010.01143.x>
- Soundrapandian, C., Sa, B., & Datta, S. (2009). Mini-Review Organic-Inorganic Composites for Bone Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 10, 1158–1171. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9308-0>
- Stansbury, J. W., & Idacavage, M. J. (2016). 3D Printing With Polymers: Challenges Among Expanding Options and Opportunities. *Dental Materials*, 32(1), 54-64.
- Stevens, L. R., Gilmore, K. J., Wallace, G. G., & In het Panhuis, M. (2016). Tissue engineering with gellan gum. *Biomaterials Science*, 4(9), 1276–1290. <https://doi.org/10.1039/c6bm00322b>
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, Vol. 11, pp. 18–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70086-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70086-5)
- Stichler, S., Böck, T., Paxton, N., Bertlein, S., Levato, R., Schill, V., ... Groll, J. (2017). Double printing of hyaluronic acid/poly(glycidol) hybrid hydrogels with poly(ϵ -caprolactone) for MSC chondrogenesis. *Biofabrication*, 9(4), 44108. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8cb7>
- Su, W.-Y., Chen, Y.-C., & Lin, F.-H. (2010). Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomaterialia*, 6(8), 3044–3055. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.037>
- Sudhamani, S. R., Prasad, M. S., & Udaya Sankar, K. (2003). DSC and FTIR studies on Gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. *Food Hydrocolloids*, 17(3), 245-250.
- Sun, M., Chen, M., Wang, M., Hansen, J., Baatrup, A., Dagnaes-Hansen, F., ... Bünger, C. E. (2016). In vivo drug release behavior and osseointegration of a doxorubicin-loaded tissue-engineered scaffold. *RSC Advances*, 6(80), 76237–76245. <https://doi.org/10.1039/c6ra05351c>
- Sun, X., Gao, H., Wu, G., Wang, Y., Fan, Y., & Ma, J. (2011). Biodegradable and temperature-responsive polyurethanes for adriamycin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 412(1–2), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.007>
- Sun, Y., & Huang, Y. (2016). Disulfide-crosslinked albumin hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(16), 2768–2775. <https://doi.org/10.1039/C6TB00247A>
- Swioklo, S., Ding, P., Pacek, A. W., & Connon, C. J. (2017). Process parameters for the high-scale production of alginate-encapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. *Process Biochemistry*, 59(Part B), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.005>

- Ta, H. T., Dass, C. R., Choong, P. F. M., & Dunstan, D. E. (2009). Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 247–263. <https://doi.org/10.1007/s10555-009-9186-7>
- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., & Supaphol, P. (2006). Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology*, 17(9), 2317–2329. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/9/041>
- Tamayo, L., Acuña, D., Riveros, A., Kogan, M. J., Ignacio, M., Paez, M. A., ... Cerda, E. (2018). Porous nano-gold / polyurethane scaffolds with improved antibiofilm , mechanical and thermal properties and with reduced effects on cell viability: a suitable material for soft tissue applications. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b02347>
- Tamayol, A., Akbari, M., Annabi, N., Paul, A., Khademhosseini, A., & Juncker, D. (2013). Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities. *Biotechnology Advances*, 31(5), pp. 669–687. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.007>
- Tan, H., & Hu, X. (2012). Injectable in situ forming glucose-responsive dextran-based hydrogels to deliver adipogenic factor for adipose tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 126(S1), E180–E187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.36737>
- Temple, J. P., Hutton, D. L., Hung, B. P., Huri, P. Y., Cook, C. A., Kondragunta, R., ... Grayson, W. L. (2014). Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(12), 4317–4325. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35107>
- Thannhauser, T. W., Konishi, Y., & Scheraga, H. A. (1987). Analysis for Disulfide Bonds in Peptides and Proteins. *Methods in Enzymology*, 143(C), 115–119. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43020-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43020-6)
- Tibbits, S. (2014). 4D Printing: Multi-Material Shape Change. *Architectural Design*, 84(1), 116-121.
- Travinskaya, T., & Savelyev, Y. (2016). Aqueous polyurethane dispersions sodium-alginate based blends and hydrogels. *Frontiers in Heterocyclic Chemistry*, 2(1), 20–25. <https://doi.org/10.11648/j.ajhc.20160201.14>
- Tsang, V. L., & Bhatia, S. N. (2006). Fabrication of three-dimensional tissues. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 103(December 2005), 189–205. https://doi.org/10.1007/10_010
- Tsang, V. L., & Bhatia, S. N. (2007). Fabrication of Three-Dimensional Tissues BT - Tissue Engineering II: Basics of Tissue Engineering and Tissue Applications (K. Lee & D. Kaplan, Eds.). https://doi.org/10.1007/10_010
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 57, pp. 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Uludag, H., Patterson, J., Leuven, K. U., Baiguera, S., Vrana, N. E., Fathi-Achachelouei, M., ... Engin Vrana, N. (2019). Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* www.frontiersin.org, 1, 113. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00113>
- Uma Maheshwari, S., Samuel, V. K., & Nagiah, N. (2014). Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application. *Ceramics International*, 40(6), 8469–8477. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.01.058>
- Uman, S., Dhand, A., & Burdick, J. A. (2020). Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(25), 1–20. <https://doi.org/10.1002/app.48668>
- Unagolla, J. M., & Jayasuriya, A. C. (2020). Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Applied Materials Today*, 18, 100479. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100479>
- Ungaro, F., Biondi, M., Indolfi, L., Rosa, G. De, Rotonda, M. I. La, Quaglia, F., & Netti, P. (2005). Bioactivated Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. In *Topics in Tissue Engineering* (Vol. 2, pp. 1–38).

- Unnithan, A. R., Gnanasekaran, G., Sathishkumar, Y., Lee, Y. S., & Kim, C. S. (2014). Electrospun antibacterial polyurethane-cellulose acetate-zein composite mats for wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 884–892. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.070>
- Usman, A., Zia, K. M., Zuber, M., Tabasum, S., Rehman, S., & Zia, F. (2016). Chitin and chitosan based polyurethanes: A review of recent advances and prospective biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 630–645. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.004>
- V. Thomas, L., VG, R., & D. Nair, P. (2017). Effect of stiffness of chitosan-hyaluronic acid dialdehyde hydrogels on the viability and growth of encapsulated chondrocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1925–1935. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.116>
- Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354(SUPPL.1), 32–34. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)90247-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)90247-7)
- Valot, L., Martinez, J., Mehdi, A., & Subra, G. (2019). Chemical insights into bioinks for 3D printing. *Chemical Society Reviews*, 48(15), 4049–4086. <https://doi.org/10.1039/C7CS00718C>
- Visser, J., Peters, B., Burger, T. J., Boomstra, J., Dhert, W. J. A., Melchels, F. P. W., & Malda, J. (2013). Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs. *Biofabrication*, 5(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/3/035007>
- Walker, C., Mojares, E., & Del Río Hernández, A. (2018). Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, p. 3028. <https://doi.org/10.3390/ijms19103028>
- Wang, C., Gong, Y., Lin, Y., Shen, J., & Wang, D. -A. (2008a). A Novel Gellan Gel-Based Microcarrier for Anchorage-Dependent Cell Delivery. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1226-1234.
- Wang, L. L., & Burdick, J. A. (2017). Engineered Hydrogels for Local and Sustained Delivery of RNA-Interference Therapies. *Advanced Healthcare Materials*, 6(1), 1601041. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201601041>
- Wang, L. L., Highley, C. B., Yeh, Y. C., Galarraga, J. H., Uman, S., & Burdick, J. A. (2018a). Three-dimensional extrusion bioprinting of single- and double-network hydrogels containing dynamic covalent crosslinks. *Journal of Biomedical Materials Research-Part A*, 106(4), 865-875.
- Wang, L., Seshareddy, K., Weiss, M. L., & Detamore, M. S. (2009). Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering. *Tissue Engineering - Part A*, 15(5), 1009–1017. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0012>
- Wang, T., Turhan, M., & Gunasekaran, S. (2004). Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International*, 53(7), 911–918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.1461>
- Wang, W., Guo, Y., & Otaigbe, J. U. (2008b). Synthesis and characterization of novel biodegradable and biocompatible poly(ester-urethane) thin films prepared by homogeneous solution polymerization. *Polymer*, 49(20), 4393–4398. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.07.057>
- Wang, Xiaojian, Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., ... Xie, Y. M. (2016). Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*, Vol. 83, pp. 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>
- Wang, Xiong, Zhang, X., Dai, X., Wang, X., Li, X., Diao, J., & Xu, T. (2018b). Tumor-like lung cancer model based on 3D bioprinting. *3 Biotech*, 8(12), 501. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1519-1>
- Wang, Y., Sun, L., Mei, Z., Zhang, F., He, M., Fletcher, C., Wang, F., Yang, J., Bi, D., Jiangf, Y., Liug, P. (2020). 3D printed biodegradable implants as an individualized drug delivery system for local chemotherapy of osteosarcoma. *Mater. Des.* 186, 108336. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108336>
- Wang, Y., Shi, W., Kuss, M., Mirza, S., Qi, D., Krasnoslobodtsev, A., ... Duan, B. (2018c). 3D Bioprinting of Breast Cancer Models for Drug Resistance Study. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(12), 4401–4411. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01277>

- Wei, Z., Yang, J. H., Zhou, J., Xu, F., Zrínyi, M., Dussault, P. H., ... Chen, Y. M. (2014). Self-healing gels based on constitutional dynamic chemistry and their potential applications. *Chemical Society Reviews*, 43(23), 8114–8131. <https://doi.org/10.1039/C4CS00219A>
- Weng, L., Pan, H., & Chen, W. (2008). Self-crosslinkable hydrogels composed of partially oxidized hyaluronan and gelatin: In vitro and in vivo responses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85A(2), 352–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.31491>
- Williams, D., Thayer, P., Martinez, H., Gatenholm, E., & Khademhosseini, A. (2018). A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting. *Bioprinting*, 9, 19–36. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2018.02.003>
- Wilson, S. A., Cross, L. M., Peak, C. W., & Gaharwar, A. K. (2017). Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(50), 43449–43458.
- Wolf, M. T., Dearth, C. L., Sonnenberg, S. B., Lobo, E. G., & Badylak, S. F. (2015). Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 84, pp. 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.011>
- Wolinsky, J. B., Colson, Y. L., & Grinstaff, M. W. (2012). Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release*, Vol. 159, pp. 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.031>
- Wu, D., Yu, Y., Tan, J., Huang, L., Luo, B., Lu, L., & Zhou, C. (2018a). 3D bioprinting of gellan gum and poly (ethylene glycol) diacrylate based hydrogels to produce human-scale constructs with high-fidelity. *Materials and Design*, 160, 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.09.040>
- Wu, M., Chen, J., Huang, W., Yan, B., Peng, Q., Liu, J., ... Zeng, H. (2020). Injectable and Self-Healing Nanocomposite Hydrogels with Ultrasensitive pH-Responsiveness and Tunable Mechanical Properties: Implications for Controlled Drug Delivery. *Biomacromolecules*, 21(6), 2409–2420. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00347>
- Wu, S.-C., Chang, J.-K., Wang, C.-K., Wang, G.-J., & Ho, M.-L. (2010). Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment. *Biomaterials*, 31(4), 631–640. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.089>
- Wu, Y., Lin, Z. Y., Wenger, A. C., Tam, K. C., Tang, X. (2018b). 3D bioprinting of liver-mimetic construct with alginate/cellulose nanocrystal hybrid bioink. *Bioprinting*, 9, 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2017.12.001>
- Wuestenberg, T. (2014). *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons.
- Xavier, J. R., Thakur, T., Desai, P., Jaiswal, M. K., Sears, N., Cosgriff, H. E., Kaunas, R., Gaharwar, A. K. (2015). Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS Nano*, 9(3), 3109–3118. <https://doi.org/10.1021/nn507488s>
- Xu, Cancan, Huang, Y., Wu, J., Tang, L., & Hong, Y. (2015). Triggerable degradation of polyurethanes for tissue engineering applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(36), 20377–20388. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06242>
- Xu, Changxue, Zhang, M., Huang, Y., Ogale, A., Fu, J., & Markwald, R. R. (2014). Study of droplet formation process during drop-on-demand inkjetting of living cell-laden bioink. *Langmuir*, 30(30), 9130–9138. <https://doi.org/10.1021/la501430x>
- Xu, L., Qiu, Z., Gong, H., Zhu, C., Li, Z., Li, Y., & Dong, M. (2019). Rheological behaviors of microbial polysaccharides with different substituents in aqueous solutions: Effects of concentration, temperature, inorganic salt and surfactant. *Carbohydrate Polymers*, 219, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.032>
- Xu, T., Binder, K. W., Albanna, M. Z., Dice, D., Zhao, W., Yoo, J. J., & Atala, A. (2013). Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication*, 5(1), 015001. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015001>

- Yamada, A., Niikura, F., & Ikuta, K. (2008). A three-dimensional microfabrication system for biodegradable polymers with high resolution and biocompatibility. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(2). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/2/025035>
- Yamamoto, F., & Cunha, R. L. (2007). Acid gelation of gellan : Effect of final pH and heat treatment conditions. 68, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.009>
- Yang, B., Zhang, Y., Zhang, X., Tao, L., Li, S., & Wei, Y. (2012). Facilely prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier. *Polymer Chemistry*, 3(12), 3235–3238. <https://doi.org/10.1039/C2PY20627G>
- Yang, H., Leow, W. R., Wang, T., Wang, J., Yu, J., He, K., . . . Chen, X. (2017). 3D Printed Photoresponsive Devices Based on Shape Memory Composites. *Advanced Materials*, 29(33), 1701627.
- Yavvari, P. S., Pal, S., Kumar, S., Kar, A., Awasthi, A. K., Naaz, A., . . . Bajaj, A. (2017). Injectable, Self-Healing Chimeric Catechol-Fe(III) Hydrogel for Localized Combination Cancer Therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(12), 3404–3413. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00741>
- Yin, J., Yan, M., Wang, Y., Fu, J., Suo, H. (2018). 3D Bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10(8), 6849–6857. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16059>
- Ying, G. L., Jiang, N., Mahar, S., Yin, Y. X., Chai, R. R., Cao, X., Yang, J. Z., Miri, A. K., Hassan, S., Zhang, Y. S. (2018). Aqueous two-phase emulsion bioink-enabled 3D bioprinting of porous hydrogels. *Adv. Mater.*, 30(50), 1805460. <https://doi.org/10.1002/adma.201805460>
- Yoo, H. S., Lee, E. A., Yoon, J. J., & Park, T. G. (2005). Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 26(14), 1925–1933. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.021>
- You, B., Li, Q., Dong, H., Huang, T., Cao, X., & Liao, H. (2018). Bilayered HA/CS/PEGDA hydrogel with good biocompatibility and self-healing property for potential application in osteochondral defect repair. *Journal of Materials Science & Technology*, 34(6), 1016–1025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmst.2017.11.016>
- You, F., Eames, B. F., & Chen, X. (2017). Application of Extrusion-Based Hydrogel Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1597. <https://doi.org/10.3390/ijms18071597>
- Yu, D. G., Zhu, L.-M., Brandford-White, C. J., Yang, X. L. (2008). Three-Dimensional Printing in Pharmaceuticals: Promises and Problems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(9), 3666–3690. <https://doi.org/10.1002/jps.21284>
- Yu, F., Cao, X., Du, J., Wang, G., & Chen, X. (2015). Multifunctional Hydrogel with Good Structure Integrity, Self-Healing, and Tissue-Adhesive Property Formed by Combining Diels–Alder Click Reaction and Acylhydrazone Bond. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(43), 24023–24031. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06896>
- Yu, Y., Zhang, Y., & Ozbolat, I. T. (2014). A Hybrid Bioprinting Approach for Scale-Up Tissue Fabrication. *J. Manuf. Sci. Eng.*, 136(6), 061013.
- Zhang, C., Wen, X., Vyavahare, N. R., & Boland, T. (2008). Synthesis and characterization of biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds fabricated by the inkjet technique. *Biomaterials*, 29(28), 3781–3791. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.009>
- Zhang, H., Ye, L., Shi, J., Du, X., & Guizani, M. (2013). Verifying cloud service-level agreement by a third-party auditor. <https://doi.org/10.1002/sec.740>
- Zhang, X., Battiston, K. G., McBane, J. E., Matheson, L. A., Labow, R. S., & Paul Santerre, J. (2016). Design of Biodegradable Polyurethanes and the Interactions of the Polymers and Their Degradation By-Products Within in Vitro and in Vivo Environments. In *Advances in Polyurethane Biomaterials* (pp. 75–114). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100614-6.00003-2>

- Zhang, Y. S., Yue, K., Aleman, J., Mollazadeh-Moghaddam, K., Bakht, S. M., Yang, J., ... Khademhosseini, A. (2017). 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 148-163. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1612-8>
- Zhang, Y., Tao, L., Li, S., & Wei, Y. (2011). Synthesis of Multiresponsive and Dynamic Chitosan-Based Hydrogels for Controlled Release of Bioactive Molecules. *Biomacromolecules*, 12(8), 2894–2901. <https://doi.org/10.1021/bm200423f>
- Zhao, X., Wu, H., Guo, B., Dong, R., Qiu, Y., & Ma, P. X. (2017b). Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 122, 34–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.011>
- Zhou, Z. F., Sun, T. W., Chen, F., Zuo, D. Q., Wang, H. S., Hua, Y. Q., ... Tan, J. (2017). Calcium phosphate-phosphorylated adenosine hybrid microspheres for anti-osteosarcoma drug delivery and osteogenic differentiation. *Biomaterials*, 121, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.12.031>
- Zhu, J. (2010). Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 31(17) 4639-4656. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>
- Zia, K. M., Anjum, S., Zuber, M., Mujahid, M., & Jamil, T. (2014). Synthesis and molecular characterization of chitosan based polyurethane elastomers using aromatic diisocyanate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.073>
- Zia, K. M., Zia, F., Zuber, M., Rehman, S., & Ahmad, M. N. (2015). Alginate based polyurethanes: A review of recent advances and perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 79, pp. 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.076>
- Zieleniewska, M., Auguścik, M., Prociak, A., Rojek, P., & Ryszkowska, J. (2014). Polyurethane-urea substrates from rapeseed oil-based polyol for bone tissue cultures intended for application in tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.03.010>
- Zorlutuna, P., Vrana, N. E., & Khademhosseini, A. (2013). The expanding world of tissue engineering: The building blocks and new applications of tissue engineered constructs. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 6, 47–62. <https://doi.org/10.1109/RBME.2012.2233468>