



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

FACOLTA' DI INGEGNERIA  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

TESI DI LAUREA

## **Sviluppo di un simulatore per il training di procedure su modello animale: manifattura e validazione**

Candidato: Roberta Morittu

Relatore: Prof.ssa Stefania Marconi  
Correlatore: Leonardo Montaldo

A.A. 2024/2025

# Indice

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>1. Sperimentazione animale</b> .....	2
1.1 Importanza del modello animale .....	2
1.2 Principio delle 3R.....	4
1.3 Uso del ratto come organismo modello.....	5
<b>2. Simulatori di ratto</b> .....	8
2.1 Obiettivo dello studio .....	9
2.2 Anatomia del ratto .....	9
2.2.1 Coda del ratto .....	14
2.3 Simulatori di ratto in commercio .....	17
<b>3. Materiali e metodi di realizzazione</b> .....	27
3.1 Dipping.....	27
3.2 Material Jetting.....	32
3.2.1 Stratasys J750 Digital Anatomy .....	35
3.2.2 Software GrabCAD .....	39
3.3 Attività sperimentale .....	43
3.3.1 Protocollo di dipping.....	43
3.3.2 Studio dei materiali .....	48
3.4 Sviluppo dei questionari di valutazione .....	52
<b>4. Risultati</b> .....	54
4.1 Realizzazione del modello finale .....	54
4.2 Validazione.....	62
<b>Conclusioni</b> .....	66
<b>Bibliografia</b> .....	68
<b>Sitografia</b> .....	72
<b>Ringraziamenti</b> .....	74

## Introduzione

Nell'ambito della sperimentazione preclinica si ricorre al modello animale per l'approvazione di farmaci e trattamenti terapeutici. A fronte delle questioni etiche e morali legate all'impiego degli animali nella ricerca scientifica, negli ultimi decenni si è sviluppato un crescente interesse verso soluzioni alternative in grado di sostituire almeno parzialmente l'uso degli animali da laboratorio. Questo approccio è in linea con il principio delle 3R, nato con lo scopo di tutelare il benessere animale. Anche nella formazione del personale di stabulario è necessario attenersi a tale principio adottando strumenti didattici alternativi, come i simulatori veterinari, che permettono di acquisire competenze pratiche e manualità prima di operare sull'animale vivo. Tra le specie più comunemente impiegate come modelli animali vi sono i ratti, sia per la loro somiglianza genetica con l'essere umano sia per ragioni di ordine pratico.

L'obiettivo di questa tesi è lo sviluppo di un simulatore di ratto, in particolare della coda, destinato al *training* di specifiche procedure di laboratorio, quali il prelievo e la somministrazione endovenosa. È stato quindi progettato un modello che riproduce la struttura anatomica e le caratteristiche biomeccaniche dei diversi tessuti della coda. La realizzazione del simulatore si basa sull'integrazione di due diverse tecniche: il processo di *dipping*, utilizzato per la creazione delle vene laterali caudali, e la tecnologia di manifattura additiva *Material Jetting*, mediante la quale è stato possibile ottenere la struttura vertebrale e la stratificazione della pelle.

La tesi è articolata in quattro capitoli. Il primo capitolo introduce il tema della sperimentazione animale e il suo ruolo nella ricerca scientifica, evidenziando le ragioni per cui non è ancora completamente sostituibile. Nel secondo capitolo vengono approfondite le caratteristiche anatomiche del ratto e vengono riportati i simulatori attualmente disponibili in commercio. Il terzo capitolo descrive i materiali e i metodi adottati per la realizzazione del modello. Infine, nel quarto capitolo, sono mostrati i risultati ottenuti e la validazione del modello finale.

Grazie a questo lavoro è stato possibile ottenere un simulatore caratterizzato da vene intercambiabili, che consente la sostituzione delle sole componenti vascolari dopo un certo numero di applicazioni e, dunque, la riutilizzabilità della restante struttura del modello. Il risultato finale supera alcune limitazioni dei simulatori attualmente disponibili in commercio, come il costo e la fedeltà anatomica; tuttavia, presenta ancora delle criticità, tra cui la mancanza di un circuito chiuso per la circolazione del liquido.

# 1. Sperimentazione animale

La sperimentazione animale occupa un ruolo fondamentale nella ricerca biomedica e rappresenta una fase obbligatoria per legge che precede la sperimentazione clinica sull'uomo. Poiché l'impiego di animali a fini scientifici solleva rilevanti questioni etiche, le attività di sperimentazione animale sono regolamentate secondo il principio delle 3R, al fine di tutelare il benessere animale.

## 1.1 Importanza del modello animale

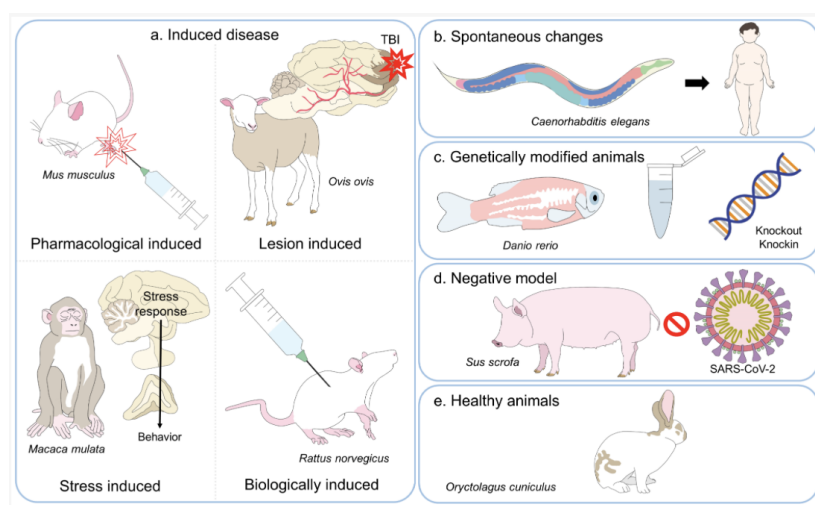
Per condurre una sperimentazione scientifica si ricorre a diversi modelli di studio, ciascuno con specifiche caratteristiche e finalità. Tra questi si distinguono i modelli *in silico*, basati su simulazioni al computer e tecniche di intelligenza artificiale, i modelli *in vitro*, che comprendono colture cellulari, organoidi e sistemi *organ-on-a-chip*, e i modelli preclinici *in vivo*, che prevedono l'uso di animali per osservare gli effetti di sostanze o condizioni sperimentali in un organismo completo. La combinazione di questi diversi modelli risulta necessaria per ottenere risultati affidabili e giungere alla sperimentazione clinica sull'uomo con il massimo livello di sicurezza possibile [1].

Il modello animale costituisce il punto di riferimento per la validazione preclinica di nuove terapie. La sua affidabilità è dimostrata dai numerosi progressi raggiunti dalla medicina nel corso del tempo, tra cui lo sviluppo di farmaci salvavita e vaccini rilevanti per la tutela della salute pubblica [2]. Un esempio dell'importanza del modello animale nella ricerca medica è l'identificazione di un gene coinvolto nello sviluppo delle metastasi umane, resa possibile grazie allo studio dello stesso gene presente nel moscerino della frutta [3]. L'impiego del modello animale prima della sperimentazione sull'uomo rappresenta un passaggio necessario per garantire la sicurezza e ridurre al minimo eventuali effetti collaterali. Alcuni effetti di una terapia, infatti, possono non apparire nelle cellule isolate usate nei modelli *in vitro*; per tale motivo è indispensabile la verifica in un organismo completo e sufficientemente complesso come il modello animale. Solo in questo modo è possibile comprendere, ad esempio, come un farmaco viene assorbito, metabolizzato e smaltito dall'organismo. Tale necessità deriva dal fatto che in natura le cellule non operano in modo isolato, ma interagiscono costantemente tra

di loro. La parentela molecolare tra animali e uomo fa sì che i risultati ottenuti dai test in specie sufficientemente simili possano fornire indicazioni predittive utili. A livello del corredo cromosomico le somiglianze tra le varie specie animali sono in numero maggiore rispetto alle differenze. Tali affinità genetiche permettono di studiare la risposta dell'organismo animale a farmaci, vaccini e trattamenti oncologici, prima di passare alla sperimentazione clinica sull'essere umano [4].

Il modello animale viene scelto in base agli obiettivi dello studio perché ogni specie condivide con l'uomo soltanto determinati aspetti biologici. La scelta del modello appropriato è fondamentale per prevenire risultati errati e per evitare lo spreco di tempo, risorse e, soprattutto, vite animali. Qualora un singolo modello risulti insufficiente, la sperimentazione su più specie diverse permette di esaminare caratteristiche differenti e di ottenere una visione più accurata del fenomeno studiato [5].

I modelli animali possono essere classificati in diverse categorie in base al tipo di modello sperimentale adottato nella ricerca, come illustrato in *Figura 1.1.1*. Tra questi vi sono i modelli di malattia indotta, in cui la patologia viene provocata artificialmente mediante farmaci, lesioni o condizioni ambientali specifiche, e i modelli basati su cambiamenti spontanei, in cui la malattia si sviluppa naturalmente nel corso della vita dell'animale. Altre categorie comprendono i modelli geneticamente modificati, ottenuti attraverso l'introduzione o la rimozione di specifici geni, i modelli negativi, costituiti da animali non suscettibili a determinate patologie, e infine gli animali sani, utilizzati come riferimento sperimentale [2].



*Figura 1.1.1: Classificazione dei principali modelli animali [2]*

## 1.2 Principio delle 3R

La sperimentazione sugli animali da laboratorio è rigorosamente regolata da norme che tutelano il benessere animale, limitandone l'utilizzo al minimo indispensabile, sulla base del principio delle 3R. Tale principio è stato enunciato nel 1959, quando venne pubblicato il saggio *The Principles of Humane Experimental Technique*, ad opera dello zoologo William MS Russell e del microbiologo Rex Burch. Il lavoro dei due accademici inglesi fu guidato dal progetto di Charles Hume, presidente della *Universities Federation for Animal Welfare* (UFAW), finalizzato a proporre strategie per minimizzare la sofferenza degli animali impiegati nella ricerca scientifica [6]. Le 3R rappresentano i principi di *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*. Sebbene il loro significato si sia evoluto nel tempo rispetto alla formulazione originaria proposta da Russell e Burch, questi concetti guidano tuttora la ricerca scientifica quando è necessario l'impiego di animali, orientando le scelte sperimentali verso criteri di maggiore eticità.

Le 3R sono definite da Russell e Burch come segue:

- *Replacement* (sostituzione) indica qualsiasi metodo scientifico che impiega materiale non senziente, come piante, microrganismi ed endoparassiti, al posto di vertebrati vivi e coscienti [7]. Il concetto di sostituzione è l'aspetto più dibattuto delle 3R poiché una sostituzione realmente efficace non è ancora stata raggiunta dato che, come discusso precedentemente, l'impiego di animali nei laboratori di ricerca rimane diffuso perché necessario in molti ambiti [6]. Il *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3R), uno dei principali enti a livello mondiale impegnati nell'applicazione delle 3R, ha fornito una definizione aggiornata del concetto del *Replacement*: «Accelerare lo sviluppo e l'uso di modelli e strumenti affidabili e predittivi, basati sulle conoscenze e le tecnologie più recenti, per sostituire gli animali nelle ricerche scientifiche che altrimenti vi farebbero ricorso». I metodi sostitutivi si dividono in due categorie: sostituzione completa e sostituzione parziale. La prima si riferisce a tutti i metodi che sostituiscono completamente l'uso degli animali, tra cui l'utilizzo di cellule e tessuti *in vitro*, modelli matematici e informatici *in silico* e anche l'uso di volontari umani. La sostituzione parziale, invece, comprende l'uso di alcuni animali che, in base al pensiero della comunità scientifica, non sono in grado di provare

sofferenza, tra cui invertebrati, forme immature di vertebrati e anche l'uso di cellule primarie prelevate da animali uccisi esclusivamente a questo scopo [8].

- *Reduction* (riduzione) indica la diminuzione del numero di animali utilizzati per ottenere determinate informazioni con la stessa precisione [7]. Questo secondo concetto evidenzia che la diminuzione del numero di animali impiegati non deve compromettere la validità scientifica e statistica della sperimentazione. La riduzione è quindi accettabile solo se consente di ottenere risultati altrettanto affidabili e precisi.
- *Refinement* (perfezionamento) consiste nella riduzione dell'incidenza o della gravità delle procedure stressanti per gli animali [7]. Il concetto della disumanità, intesa come sofferenza evitabile, è centrale nel saggio degli autori; infatti, il principio delle 3R nasce con l'obiettivo di diminuirla il più possibile.

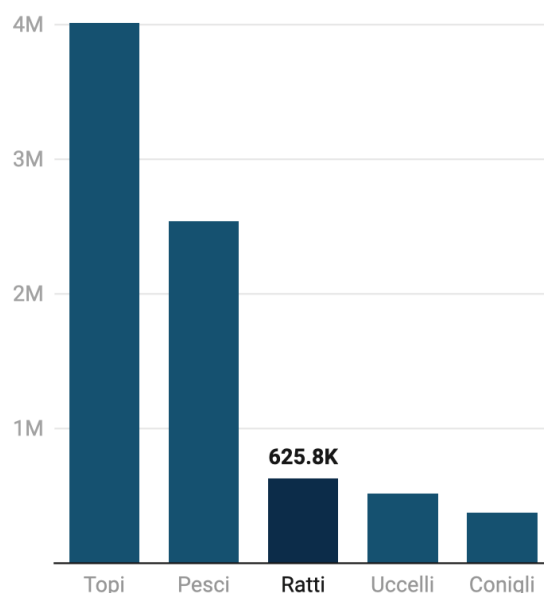
Il principio delle 3R è parte integrante della Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo, che rappresenta il riferimento normativo per la tutela del benessere degli animali utilizzati a fini scientifici in Europa. Il riconoscimento legislativo di tale principio ha favorito l'istituzione di organismi e comitati etici dedicati al monitoraggio delle pratiche di ricerca, tra cui il NC3R citato in precedenza [7].

### **1.3 Uso del ratto come organismo modello**

I roditori, in particolare topi e ratti, sono ampiamente utilizzati come organismo modello nella ricerca preclinica. Queste specie presentano numerose somiglianze con l'uomo dal punto di vista fisiologico, anatomico e genetico. Inoltre, i roditori sono spesso preferiti rispetto ad altri animali da laboratorio per motivi pratici ed economici: le loro dimensioni ridotte richiedono spazi e risorse limitati, hanno un tempo di gestazione breve, generano una prole numerosa, si sviluppano velocemente e hanno un ciclo di vita relativamente corto. Questi vantaggi li rendono modelli *in vivo* efficienti per studi sperimentali, consentendo di osservare diversi processi biologici in tempi brevi [9].

Il ratto è considerato il primo mammifero ad essere stato addomesticato per scopi scientifici. Impiegato come modello animale da oltre 150 anni, ha contribuito in modo significativo allo studio di meccanismi patogenetici e alla scoperta e convalida di nuove terapie volte a migliorare

la salute umana [10]. È la terza specie più utilizzata come animale da laboratorio, come evidenziato in *Figura 1.3.1*, sulla base dei dati statistici più recenti pubblicati dalla Commissione europea, relativi al numero di animali usati a scopi scientifici negli Stati membri e in Norvegia nel 2022 [11].



*Figura 1.3.1: Numero di animali (espresso in milioni) usati a fini scientifici, suddivisi per specie, negli Stati membri dell'Unione europea e in Norvegia nel 2022 [11]*

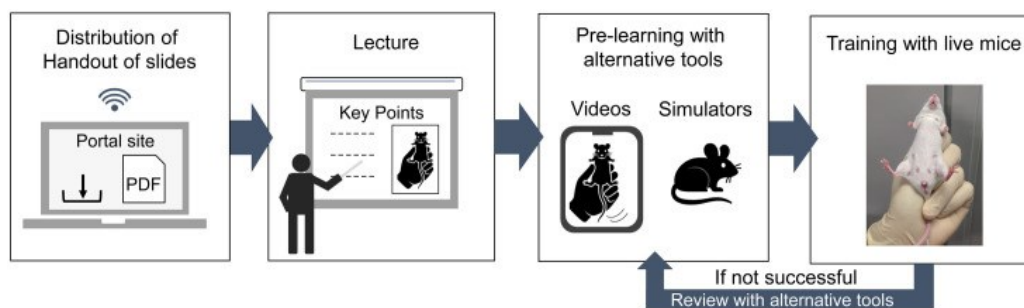
Umani e ratti possiedono un numero simile di geni, molti dei quali condivisi a causa della loro comune origine evolutiva. A causa di tale somiglianza genetica, il ratto risulta particolarmente adatto per studi di farmacologia, tossicologia, neurobiologia e malattie cardiovascolari. Inoltre, tale specie possiede un ricco repertorio comportamentale, perciò è frequentemente impiegata in studi comportamentali complessi, come quelli nell'ambito delle neuroscienze e dell'abuso di sostanze [10].

Il genere *Rattus* comprende numerose specie di ratti che presentano un'elevata variabilità morfologica ed ecologica, adattandosi a differenti ambienti naturali e antropizzati. La specie utilizzata nella ricerca scientifica è il *Rattus norvegicus*, noto anche come ratto bruno [12]. Tale specie è la più diffusa ed è stata progressivamente selezionata e allevata in condizioni controllate per generare linee geneticamente stabili, denominate ceppi (*strains*). Tra questi, i più utilizzati sono Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, Lewis e Wistar Kyoto e Fischer-344 [13]. La maggior parte dei ceppi murini è di tipo albino, caratteristica che facilita alcune

procedure sperimentali come l'identificazione di organi o l'osservazione di reazioni cutanee, che risulterebbero meno visibili in presenza di pigmentazione. Tuttavia, l'assenza di melanina rende questi animali maggiormente vulnerabili a lesioni retiniche fototossiche, compromettendo la loro capacità visiva [14]. Al contrario, i ceppi pigmentati, come Long-Evans, presentano un'acuità visiva superiore e per tale motivo vengono preferiti per studi neuroscientifici e comportamentali, dove la risposta a stimoli visivi è una variabile critica. Quindi, la scelta del ceppo più adatto dipende dalle caratteristiche fisiologiche e comportamentali richieste dallo studio e dalla necessità di standardizzare le condizioni sperimentali per garantire risultati riproducibili e comparabili [13].

## 2. Simulatori di ratto

A supporto della ricerca biomedica, il personale coinvolto nella manipolazione e gestione di animali da laboratorio, inclusi veterinari e operatori specializzati, deve essere dotato di adeguate conoscenze e competenze tecniche. Anche la formazione in questo campo deve essere coerente con il principio delle 3R, ovvero orientata alla riduzione del numero di animali utilizzati, alla diminuzione della loro sofferenza e all'impiego di metodi alternativi quando possibile. Tra questi, negli ultimi anni hanno acquisito crescente importanza strumenti didattici come video dimostrativi e simulatori veterinari, il cui uso è previsto dalla normativa europea. Come schematizzato in *Figura 2.1*, prima dell'addestramento pratico su animali vivi, il percorso formativo prevede una fase teorica, seguita dall'impiego di strumenti alternativi [15].



*Figura 2.1: Procedura formativa per la manipolazione di roditori da laboratorio [15]*

I simulatori permettono agli studenti in fase di formazione di esercitarsi su aspetti anatomici e procedurali prima di operare su animali vivi. Tali strumenti consentono di apprendere e padroneggiare tecniche operative come la manipolazione, l'immobilizzazione e le somministrazioni. In questo modo gli operatori possono ripetere le procedure per correggere gli errori senza causare stress agli animali, nel rispetto del principio delle 3R. L'utilizzo di tali dispositivi contribuisce inoltre a ridurre la tensione degli studenti alle prime esperienze, favorendo una maggiore sicurezza e preparazione prima della pratica diretta sull'animale. Sebbene i simulatori non possano sostituire completamente l'esperienza pratica con l'animale vivo, essi costituiscono una valida soluzione per sviluppare familiarità con le procedure e migliorare l'apprendimento degli studenti [15].

## 2.1 Obiettivo dello studio

Alla luce dell'importanza dei simulatori nel ridurre l'impiego di animali vivi a fini didattici, in linea con il principio delle 3R, il seguente lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto di ricerca finanziato dalla regione Lombardia, con l'obiettivo di realizzare dei simulatori di ratto da laboratorio per il *training* dei professionisti nella gestione dello stabulario. Il lavoro parte dai risultati preliminari ottenuti in un lavoro di tesi precedente, durante il quale è stato sviluppato un modello di coda di ratto, comprensivo di parte ossea e distretti vascolari pervi, ottenuto tramite la tecnica di manifattura additiva *Material Jetting*. Il modello è stato progettato con lo scopo di poter essere utilizzato per la simulazione di diverse procedure di laboratorio, come il prelievo di fluidi biologici e l'iniezione intravenosa, ed è testato dal laboratorio di Chirurgia sperimentale dell'Università di Pavia [16]. Nel seguente lavoro l'obiettivo è stato migliorare il simulatore precedente, in particolare i distretti vascolari, realizzati con una soluzione ibrida che combina tecniche di manifattura additiva e *dipping* con lattice. Anche questo simulatore è stato testato dallo stesso laboratorio di Chirurgia sperimentale.

## 2.2 Anatomia del ratto

I simulatori devono riprodurre nel modo più realistico possibile l'anatomia dell'animale vivo, per quanto riguarda sia l'aspetto visivo sia la percezione tattile. Di seguito vengono approfondite le principali caratteristiche anatomiche del ratto da laboratorio (*Rattus norvegicus*), con particolare *focus* sulla coda.

Dal punto di vista morfometrico, il peso corporeo negli individui adulti di *Rattus norvegicus* varia in funzione del sesso: le femmine presentano un peso medio compreso tra 250 e 300 g, mentre i maschi possono raggiungere anche i 500 g [17]. Inoltre, il peso e i tassi di crescita variano a seconda del ceppo [14]. L'animale può raggiungere una lunghezza complessiva di circa 40 cm, con una coda che misura circa l'85% della lunghezza del corpo, al contrario della specie *Rattus rattus*, detto anche ratto nero, che presenta una coda più lunga rispetto al corpo, come illustrato in *Figura 2.2.1* ([18], [19]).

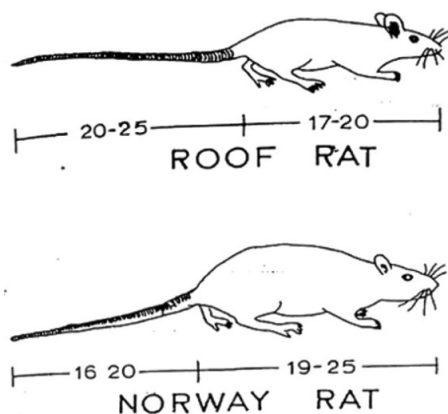


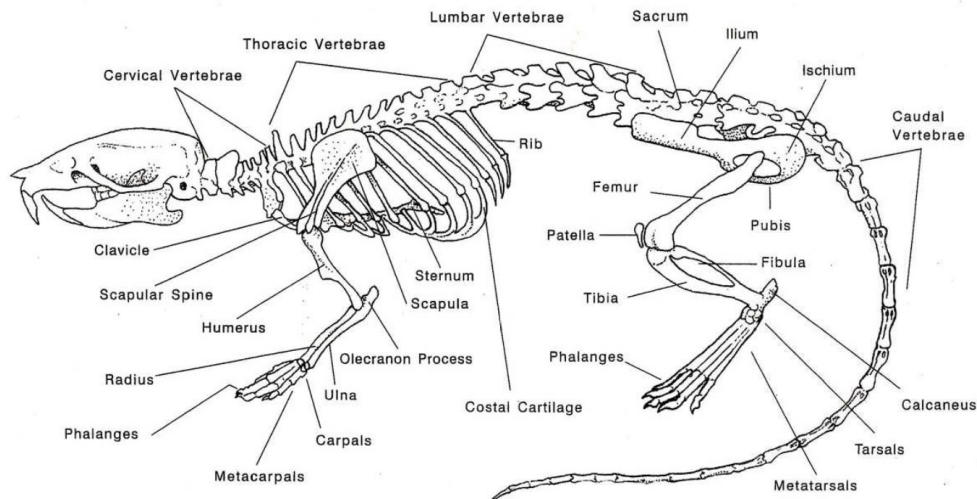
Figura 2.2.1: Confronto tra *Rattus rattus* (roof rat) e *Rattus norvegicus* (Norway rat) [19]

La durata media della vita di un ratto è di circa 2,5 - 3,5 anni, con una maggiore longevità nelle femmine. Tale aspettativa può essere influenzata dall'alimentazione: una dieta povera di grassi e ricca di proteine vegetali può contribuire ad aumentarne la durata [12]. La dieta incide inoltre sul peso corporeo. Anche la crescita può essere permanentemente alterata da diversi fattori ambientali, tra cui l'esposizione al freddo e la privazione del sonno [14].

Gli organi sensoriali del ratto sono altamente sviluppati e modulano il comportamento dell'animale. L'olfatto rappresenta il senso predominante, essenziale per il riconoscimento sociale, la rilevazione di feromoni e la comunicazione tra individui. Anche l'udito è ben sviluppato, con particolare sensibilità alle alte frequenze e la capacità di percepire e produrre vocalizzazioni nel campo degli ultrasuoni [18].

Una caratteristica distintiva dei ratti è l'assenza di canini e la presenza di incisivi particolarmente sviluppati con uno smalto contenente ferro, che conferisce loro una maggiore durezza e un colore tendente all'arancione. I denti crescono continuamente in quanto vengono consumati attraverso l'attività di rosicchiamento [17].

Il sistema scheletrico del ratto (*Figura 2.2.2*) segue lo schema tipico dei mammiferi quadrupedi, il quale si divide in scheletro assile, comprendente cranio, colonna vertebrale e gabbia toracica, e scheletro appendicolare, costituito dalle ossa degli arti. La colonna vertebrale è composta da 7 vertebre cervicali, 13 toraciche, 6 lombari, 4 sacrali e 27-30 caudali (dette anche coccigee). La parte dorsale delle costole è solitamente calcificata, quindi non sono presenti vere cartilagini costali. Gli arti anteriori e posteriori presentano ossa lunghe ben sviluppate e articolazioni funzionali. La struttura ossea, le proprietà biomeccaniche e la densità minerale ossea variano notevolmente tra i diversi ceppi di ratti [14].

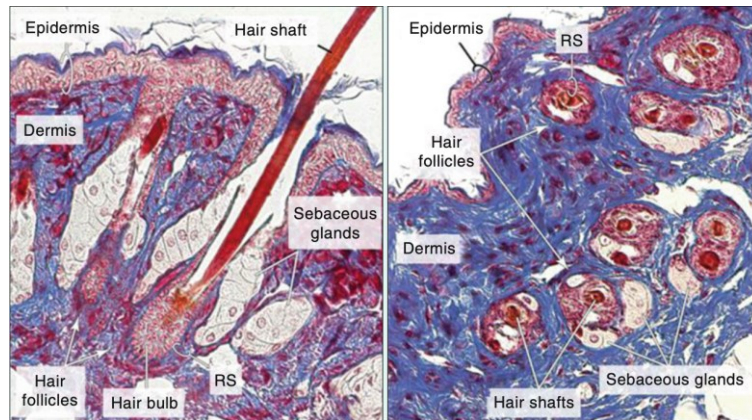


*Figura 2.2.2: Sistema scheletrico del ratto [20]*

Anche il sistema muscolare del ratto presenta un'organizzazione strutturale e funzionale tipica dei mammiferi, risultando integrato con l'apparato scheletrico e adattato alle esigenze locomotorie e comportamentali della specie. Per tali caratteristiche, esso rappresenta un modello sperimentale di riferimento per lo studio della fisiologia dell'esercizio [14].

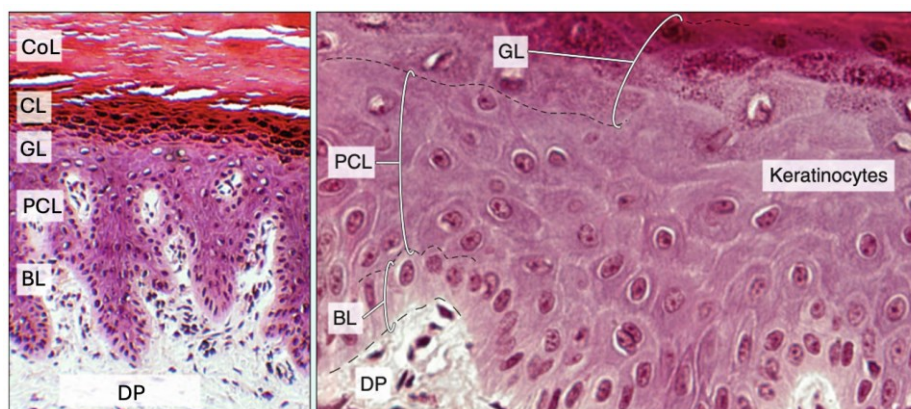
La superficie corporea è ricoperta dal mantello pilifero, ad eccezione della coda, del naso, delle labbra e della superficie palmare e plantare delle zampe. La crescita del mantello nei ratti giovani è ciclica, caratterizzata dall'alternanza di fasi di crescita e di riposo, della durata di circa 17 giorni ciascuna. La morfologia del mantello comprende diverse tipologie di peli: i peli di guardia, più lunghi, svolgono funzione protettiva e somatosensoriale; i peli più corti e fini costituiscono il sottopelo, con ruolo isolante; sono inoltre presenti sottotipi intermedi che contribuiscono alla struttura complessiva e all'efficacia termica. Oltre al mantello, il ratto è caratterizzato da peli altamente specializzati, tra cui le vibrisse, comunemente note come baffi, che rappresentano il principale organo somatosensoriale dell'animale. Disposte in file regolari ai lati del muso, le vibrisse sono associate a follicoli riccamente innervati e vascolarizzati, dotati di un sistema sinusale in grado di amplificare anche minime deflessioni del pelo [14]. In coordinazione con l'attività olfattiva e i movimenti del capo, esse consentono al roditore di percepire stimoli tattili e di orientarsi nell'ambiente circostante, anche in condizioni di scarsa illuminazione, tipiche del comportamento notturno della specie. Anche le piccole orecchie del ratto sono ricoperte da una sottile peluria specializzata [12].

La cute è organizzata in epidermide, derma e sottocute (*Figura 2.2.3*). L'epidermide è un epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato. Il derma sottostante è formato da tessuto connettivo denso ricco di fibre di collagene e ospita annessi cutanei quali follicoli piliferi, ghiandole sebacee e muscoli erettori del pelo. Nel sottocute sono presenti depositi adiposi e strutture vascolari e ghiandolari [21].



*Figura 2.2.3: Sezioni istologiche (longitudinale a sinistra, trasversale a destra) della cute con unità pilosebacea (RS: Guaina della radice del pelo) [21]*

La stratificazione dell'epidermide è evidente nelle aree di cute spessa e glabra, come mostrato nella *Figura 2.2.4*, dove si può distinguere, dal basso verso l'alto, lo strato basale, costituito da cellule mitoticamente attive; lo strato spinoso, formato da cheratinociti strettamente connessi; lo strato granuloso, caratterizzato dalla presenza di granuli di cheratoialina; lo strato lucido; e infine lo strato corneo, composto da cellule appiattite e completamente cheratinizzate [21].



*Figura 2.2.4: Epidermide della cute glabra (colorazione H&E). DP: papilla dermica; BL: strato basale; PCL: strato spinoso; GL: strato granuloso; CL: strato lucido; CoL: strato corneo [21]*

Dal punto di vista funzionale, la cute del ratto non agisce solo come barriera, ma ha un ruolo attivo nei sistemi immunitario, nervoso ed endocrino [14]. L'apparato tegumentario comprende inoltre diverse strutture ghiandolari, tra cui ghiandole sebacee associate ai follicoli piliferi e ghiandole sudoripare localizzate prevalentemente nei cuscinetti plantari, con funzione legata principalmente al mantenimento dell'adesione e non alla dispersione del calore. Il ratto non dispone pertanto di un sistema sudoriparo efficace, a differenza di altri mammiferi; di conseguenza, il sistema cardiovascolare svolge un ruolo compensatorio nella termoregolazione [12].

Il ratto, come gli altri mammiferi, presenta un sistema cardiovascolare chiuso formato dal cuore e dalla rete di vasi sanguigni, strettamente integrato con gli altri apparati, in particolare con quello tegumentario e muscolare, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo [14]. La vascolarizzazione è particolarmente rilevante in alcuni distretti corporei, dove assume funzioni specifiche oltre al semplice trasporto di ossigeno, nutrienti e metaboliti. In particolare, strutture come la coda e le orecchie, caratterizzate da un'elevata vascolarizzazione, permettono la dispersione del calore attraverso variazioni del flusso ematico, mediante processi di vasodilatazione e vasocostrizione [12].

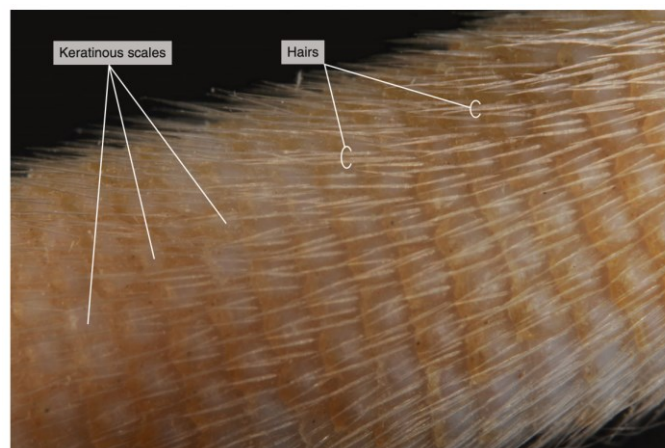
Il cuore, situato nella cavità toracica e leggermente spostato a sinistra, è suddiviso in quattro camere (due atri e due ventricoli). Dal ventricolo sinistro origina l'aorta che, dopo aver descritto l'arco aortico, prosegue come aorta discendente lungo il torace e l'addome. Da essa si dipartono i rami arteriosi destinati all'irrorazione degli organi viscerali, tra cui il tronco celiaco, l'arteria mesenterica craniale e le arterie renali [14]. A livello istologico, i vasi sanguigni sono costituiti da diversi tipi cellulari, tra cui cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e fibroblasti, organizzati in modo da conferire proprietà meccaniche e funzionali specifiche. Queste componenti cellulari si organizzano in una struttura comune nei mammiferi, caratterizzata da tre tonache concentriche distinte:

- tonaca intima: lo strato più interno, costituito da un monostrato di cellule endoteliali poggianti su una membrana basale;
- tonaca media: formata da cellule muscolari lisce e fibre elastiche, responsabile della regolazione del tono vascolare;
- tonaca avventizia: lo strato esterno di natura connettivale.

L'organizzazione e lo spessore relativo di tali strati variano significativamente in base al tipo di vaso e alle sollecitazioni emodinamiche a cui è sottoposto [22].

### 2.2.1 Coda del ratto

La coda ha una lunghezza media di 18 cm e tende ad assottigliarsi man mano che si procede verso la parte distale. La cute, mostrata in *Figura 2.2.1.1*, è costituita da oltre 210 squame sovrapposte orientate in senso caudale, caratterizzate da un marcato grado di cheratinizzazione nello strato epidermico superficiale. Sotto ogni piccola squama epidermica emergono brevi setole. L'intera superficie della coda è inoltre rivestita da uno strato di sebo di colore giallo-aranciato ([12], [21]).



*Figura 2.2.1.1: Cute della coda di ratto [21]*

Il movimento della coda è determinato dalla coordinazione tra contrazione e rilassamento dei quattro muscoli coccigei, da cui dipende la flessione dell'asse longitudinale delle vertebre coccigee. Le prime quattro vertebre coccigee (Co1-Co4) situate nella cavità pelvica, non sono mobili, al contrario delle altre vertebre coccigee, le quali presentano maggiore libertà di movimento perché non sono limitate dai rispettivi processi articolari. Inoltre, tali vertebre sono caratterizzate da superfici leggermente concave che permettono la flessione della coda. Come schematizzato in *Figura 2.2.1.2*, la disposizione delle vertebre coccigee può assumere configurazioni diverse, passando da un andamento lineare a uno curvo in funzione della loro flessione lungo l'asse caudale [23].

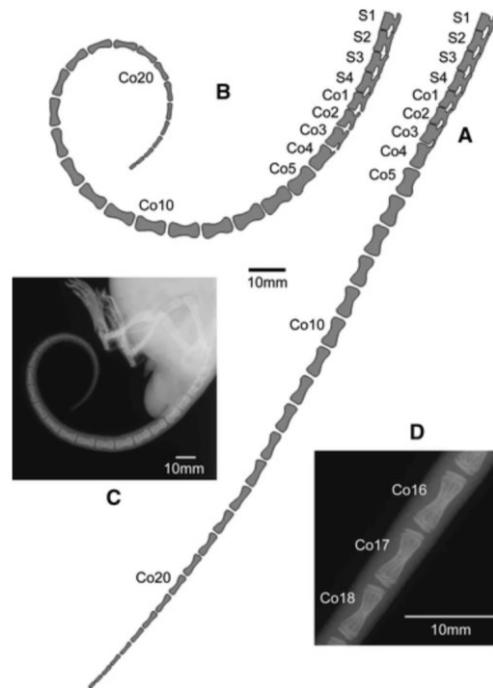


Figura 2.2.1.2: Illustrazione schematica, basata su immagini radiografiche, della disposizione delle vertebre caudali del roditore nelle configurazioni lineare (A) e curva (B) della coda, con dettaglio della struttura scheletrica (barra di scala: 10 mm)

Durante il movimento in avanti, i ratti mantengono la coda estesa orizzontalmente all'indietro; durante i cambi di direzione, invece, la piegano verso il lato della rotazione. Questo comportamento suggerisce un ruolo della coda nel mantenimento dell'equilibrio durante il movimento [23].

La coda del ratto presenta una vena dorsale, due vene laterali disposte simmetricamente e un'arteria ventrale, come raffigurato nella Figura 2.2.1.3 [24].

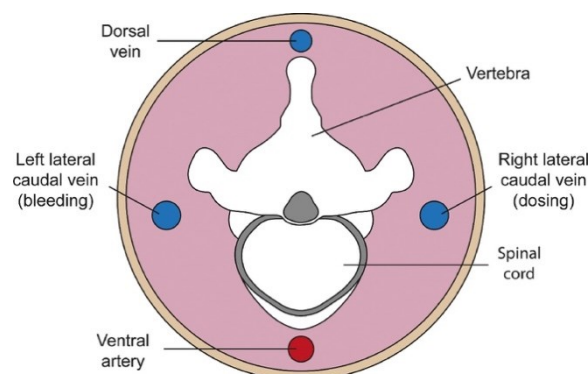


Figura 2.2.1.3: Sezione trasversale della coda di ratto [24]

Tale schema rappresenta una semplificazione di una rete vascolare più complessa, caratterizzata dalla presenza di vasi anastomotici segmentali che collegano le diverse strutture vascolari e permettono il passaggio diretto del sangue dal sistema arterioso a quello venoso bypassando il letto capillare [25]. Questa organizzazione vascolare assume rilevanza dal punto di vista fisiologico, in quanto il ratto regola la temperatura corporea principalmente attraverso la vasodilatazione dei vasi sanguigni della coda [17]. La regolazione del flusso sanguigno nella coda del ratto è mediata dal sistema nervoso simpatico, in grado di modulare il calibro vascolare in risposta a stimoli termici e fisiologici, tra cui lo stress che esercita un effetto inibitorio sulla vasodilatazione [25]. Tale fenomeno viene sfruttato nelle procedure di prelievo e somministrazione endovenosa. Il riscaldamento dell'animale e della coda (ad esempio mediante immersione in acqua calda) induce una dilatazione dei vasi, rendendoli più visibili e accessibili [12]. L'applicazione di una leggera pressione lungo la coda può ulteriormente migliorarne la visibilità [26].

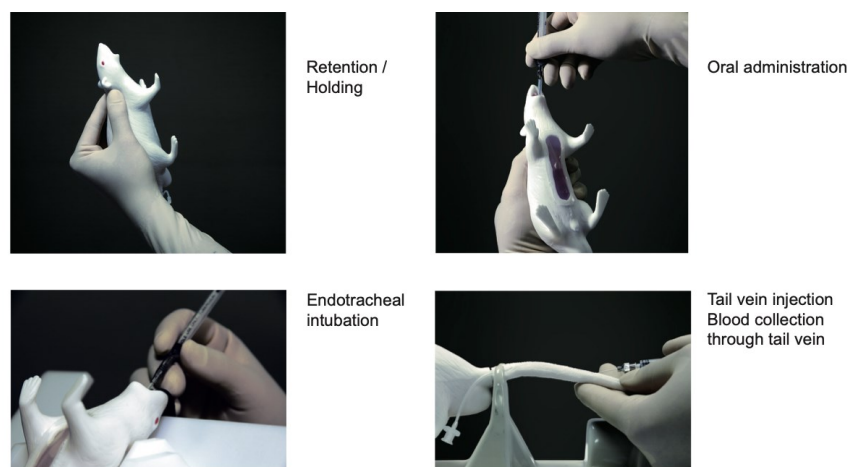
Le vene laterali rappresentano il sito preferenziale per il prelievo e il dosaggio endovenoso, poiché sono le più grandi e mostrano una vasodilatazione più evidente rispetto alla vena dorsale e all'arteria ventrale [24]. Nelle procedure sperimentali sulla coda di ratto, il calibro dell'ago viene selezionato in funzione del diametro del vaso, risultando uguale o leggermente inferiore a quest'ultimo. La vena può essere perforata a circa 3 cm dalla punta usando aghi di calibro compreso tra 23G e 26G (corrispondenti a un diametro di circa 0,6 - 0,45 mm) e la raccolta del sangue avviene lasciandolo defluire per gocciolamento in un apposito contenitore. Tuttavia, il flusso venoso è più lento rispetto a quello arterioso. Perciò, il prelievo dall'arteria ventrale costituisce una valida alternativa quando si necessita di un flusso ematico più rapido, grazie alla pressione arteriosa, consentendo di ottenere volumi relativamente elevati (circa 1 ml) con una singola puntura. L'arteria viene perforata utilizzando aghi di calibro 24G o 26G (circa 0,55 - 0,45 mm di diametro) [26].

Il volume ematico totale del ratto è compreso tra 58 e 70 ml/kg, pari in media a circa il 6,4% del peso corporeo. Tale volume è ridotto in soggetti anziani o obesi. Per garantire il benessere dell'animale, il volume di sangue prelevato in una singola procedura non dovrebbe superare il 10% del volume ematico totale. Ad esempio, in un ratto di 400 g, il volume di sangue complessivo è di circa 25,6 ml e il prelievo massimo consigliato è quindi di circa 2,5 ml [26].

## 2.3 Simulatori di ratto in commercio

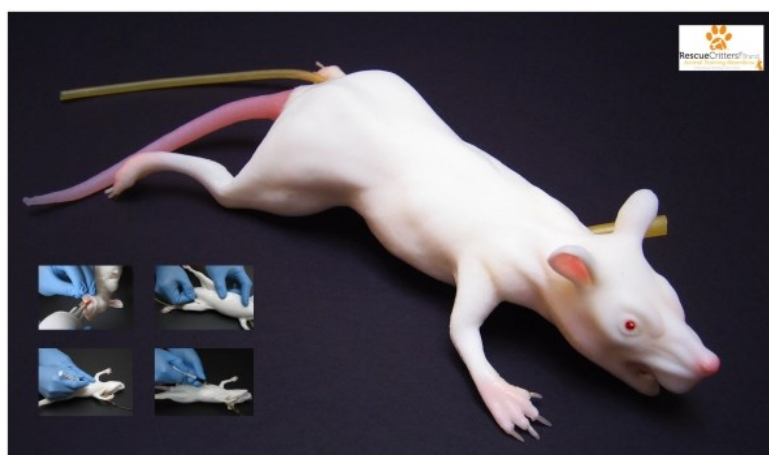
Negli ultimi decenni sono stati messi in commercio simulatori di ratto con caratteristiche differenti, progettati per essere utilizzati come strumenti di apprendimento per i ricercatori coinvolti nella sperimentazione animale. La maggior parte di questi modelli rappresenta l'animale per intero, compreso di corpo e coda, ad eccezione di uno, che è invece dedicato esclusivamente alla simulazione della coda.

Il simulatore Natsume Rat KN-590, sviluppato dall'azienda giapponese Natsume Seisakusho Co, Ltd. offre una rappresentazione anatomica completa del ratto, includendo faringe, laringe, trachea, bronchi, esofago e stomaco. Realizzato in silicone, il dispositivo presenta caratteristiche tattili che riproducono realisticamente i tessuti biologici. La coda, lunga circa 18 cm, è dotata di una vena caudale riempibile con sangue artificiale ed è progettata per tollerare numerose iniezioni. Quando necessario la coda può essere sostituita ed è compatibile con la versione del modello precedente, denominato Koken Rat, attualmente fuori produzione, che differisce per morfologia e colore del corpo ([27], [28]). Gli utenti possono acquisire competenze pratiche sia nelle procedure di prelievo ematico e di iniezione, sia nell'intubazione endotracheale e nella somministrazione di sostanze per via orale mediante sonda, il cui corretto posizionamento è verificabile grazie all'addome parzialmente trasparente. Il simulatore consente inoltre di apprendere le corrette modalità di manipolazione e contenimento dell'animale. Le procedure, mostrate in *Figura 2.3.1*, possono essere ripetute più volte, favorendo un apprendimento progressivo.



*Figura 2.3.1: Simulatore Natsume Rat e dimostrazione delle procedure [27]*

L'azienda americana Rescue Critters® ha sviluppato il simulatore Mimolette Lab Rat (*Figura 2.3.2*), progettato per l'addestramento in specifiche procedure sperimentali, tra cui l'intubazione endotracheale, la puntura cardiaca e il prelievo di sangue dalla vena safena. Il modello riproduce strutture anatomiche rilevanti quali polmoni, cuore e sistema vascolare. Il kit è fornito completo di sangue artificiale e accessori per la somministrazione endovenosa. Il prezzo indicativo del dispositivo è pari a 1.339,00 \$ [29].



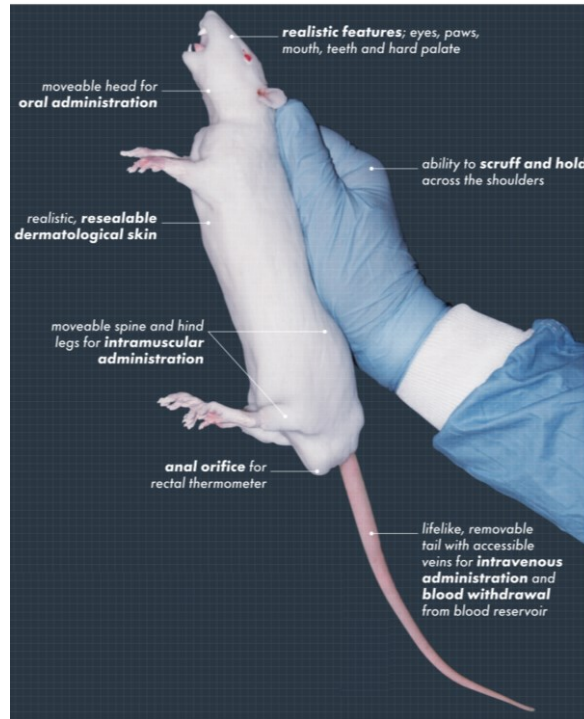
*Figura 2.3.2: Simulatore Mimolette Lab Rat [29]*

Il simulatore Squeekums Rat Mannikin (*Figura 2.3.3*), venduto dalla stessa azienda, è un modello di ratto rivestito da pelliccia sintetica di colore marrone, con peso paragonabile a quello di un ratto adulto. La coda è removibile e sostituibile, essendo monouso, e consente di simulare l'accesso endovenoso attraverso la vena caudale. Sono inoltre disponibili padiglioni auricolari intercambiabili, che permettono l'addestramento alle procedure di marcatura auricolare (*ear tagging*). Il dispositivo consente movimenti realistici della testa, degli arti e delle estremità, favorendo l'apprendimento delle corrette tecniche di manipolazione e contenimento del roditore in condizioni di sicurezza. Il costo indicativo del modello è di 968,00 \$ e le componenti aggiuntive sono disponibili separatamente (la coda di ricambio costa 27,00 \$, mentre le orecchie sostitutive 23,00 \$) [30].



Figura 2.3.3: Simulatore Squeekums Rat Mannikin e pezzi sostitutivi [30]

Il simulatore CurVet™ Rat (Figura 2.3.4), prodotto dall'azienda inglese Vet-Tech Solutions, è realizzato con un materiale progettato per riprodurre una sensibilità tattile il più possibile simile a quella di un esemplare vivente. Il modello presenta una pelle dermatologicamente realistica, che consente l'esecuzione di iniezioni attraverso le principali vie di somministrazione convenzionali, l'identificazione di microchip e l'esercitazione nelle tecniche di manipolazione e contenimento dell'animale, inclusa la presa per la plica cutanea del collo. L'assenza di pelliccia è voluta per facilitare le operazioni di pulizia e igienizzazione mediante appropriato sterilizzatore chimico. Dal punto di vista funzionale, il simulatore è dotato di mobilità della testa, della colonna vertebrale e degli arti posteriori. È inoltre adatto alla simulazione della somministrazione orale e al monitoraggio della temperatura corporea. Presenta dettagli realistici, come incisivi, occhi ed estremità pigmentate, che contribuiscono ad una maggiore fedeltà anatomica. Le dimensioni e il peso del simulatore corrispondono a quelli di un ratto adulto. La coda è provvista di due vene laterali e risulta idonea per il prelievo di sangue, la somministrazione endovenosa e l'inserimento di cateteri flessibili. È realizzata con un materiale che garantisce una lunga durata anche dopo ripetute procedure, è removibile e sostituibile quando serve. Il costo indicativo è di \$1995.00 [31].



*Figura 2.3.4: Simulatore CurVet™ Rat [31]*

Più recentemente, la startup inglese AnthroTek ha sviluppato un simulatore di ratto da laboratorio, denominato AnthroRat (*Figura 2.3.5*), realizzato in silicone mediante modellazione e stampa 3D dei relativi stampi. Il dispositivo riproduce fedelmente le strutture anatomiche del roditore e consente di eseguire iniezioni sottocutanee, intramuscolari e intraperitoneali, simulando una realistica resistenza all'ago e permettendo di ripetere le procedure più di 50 volte sullo stesso modello senza comprometterne l'integrità [32].



*Figura 2.3.5: Simulatore AnthroRat [32]*

Il simulatore della coda di ratto, prodotto dall'azienda giapponese CLEA Japan, Inc. e commercializzato da Hundred Co., Ltd. con il nome Humaneway™ (Figura 2.3.6), è un dispositivo dedicato esclusivamente al *training* professionale sulle procedure relative alla coda. Il modello riproduce la sensazione tattile e l'anatomia della coda di un ratto di circa 10 settimane di età, con una lunghezza totale di 180 mm. I vasi sanguigni, che simulano le vene laterali caudali, presentano un diametro variabile, passando da 1,0 mm alla base della coda a 0,5 mm in prossimità della punta. Il simulatore permette di praticare il prelievo di sangue e le iniezioni endovenose in modo ripetibile, garantendo una sensazione di penetrazione con l'ago simile a quella in un organismo vivente grazie all'utilizzo di un materiale silconico compatto. Inoltre, vi è la possibilità di regolare la visibilità delle vene variando la concentrazione del sangue artificiale, permettendo così di modulare la difficoltà dell'esercizio al livello di esperienza dell'utente [33]. Il costo dell'unità è di 232 \$ [34].



Figura 2.3.6: Simulatore Humaneway™ [34]

Un dispositivo dall'aspetto analogo è proposto dall'azienda tedesca Erler-Zimmer Medical GmbH all'interno di un kit che include anche un apposito supporto e una siringa, come mostrato in Figura 2.3.7. Il prezzo indicativo del solo simulatore di coda è di 364 euro, IVA esclusa [35].



Figura 2.3.7: Kit proposto dall'azienda Erler-Zimmer compreso di simulatore, supporto e siringa [35]

Per quanto riguarda simulatori di coda realizzati mediante tecniche di manifattura additiva, in letteratura è riportato lo sviluppo di un modello di coda di topo (non di ratto), prodotto con tecnologia *Digital Light Processing* (DLP) [36]. Questo simulatore è stato progettato nell'ambito dello *Zurich Integrative Rodent Physiology* (ZIRP), grazie alla collaborazione tra ricercatori nel campo delle scienze animali e ingegneri esperti in tecnologie di stampa 3D, e successivamente messo in commercio dall'azienda tedesca Vetiqo [37]. Si tratta di un simulatore riutilizzabile, caratterizzato da buona durabilità e dalla presenza di canali interni che permettono di simulare l'iniezione endovenosa tramite fluidi artificiali. I dati preliminari raccolti tramite questionari mostrano che il modello è stato ben accettato, con giudizi positivi sul realismo anatomico e sulla sua efficacia nel contesto formativo. Emerge inoltre una crescente richiesta di dispositivi analoghi, a dimostrazione del potenziale delle tecnologie di stampa 3D nella creazione di modelli di *training* realistici e funzionali [38].

Anche il progetto di ricerca "SimulRATor" nasce con l'obiettivo di sviluppare un nuovo simulatore di ratto stampato in 3D che sia realistico dal punto di vista anatomico e tattile, sfruttando la tecnologia *Multi-Jet-Modelling* (MJM) per realizzare le diverse strutture, ad eccezione della pelle, realizzata in silicone mediante la tecnica di *mold-modelling*. La base per la progettazione di tale modello sono i risultati ottenuti da una valutazione sistematica dei

simulatori di ratto disponibili in commercio, al fine di analizzare e confrontare la loro correttezza anatomica e avere maggiori informazioni sulla frequenza del loro utilizzo e sulla loro idoneità pratica [39].

Il progetto ha previsto tre studi distinti, caratterizzati da differenti prospettive metodologiche:

- valutazione anatomica da parte di veterinari esperti [28];
- analisi dell'efficacia di apprendimento da parte degli studenti dei corsi di specializzazione in scienze degli animali da laboratorio [40];
- analisi dell'implementazione e soddisfazione da parte di trainer e supervisori [41].

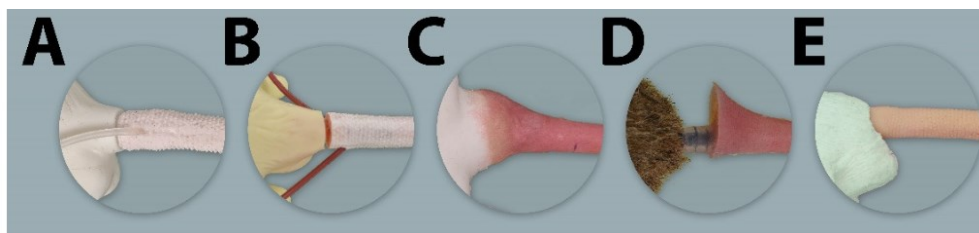
Tale approccio multi-prospettico ha permesso una comprensione complessiva delle prestazioni dei simulatori.

Il primo studio ha come obiettivo l'identificazione dei punti di forza e delle criticità anatomiche di cinque simulatori di ratto disponibili in commercio [28]. Questi modelli sono stati indicati in forma anonimizzata come simulatori A-E, ma corrispondono a quelli elencati precedentemente:

- A) Natsume Rat
- B) Koken Rat
- C) Mimolette Lab Rat
- D) Squeekums Rat Mannikin
- E) CurVet Rat

La valutazione è stata condotta da 14 veterinari specializzati in anatomia veterinaria o in scienze degli animali da laboratorio, i quali per ciascun simulatore hanno analizzato sia l'aspetto visivo sia la percezione tattile di quattro aree anatomiche (aspetto generale, testa, arti e coda). Le risposte ai questionari sono state analizzate a livello statistico per verificarne la significatività.

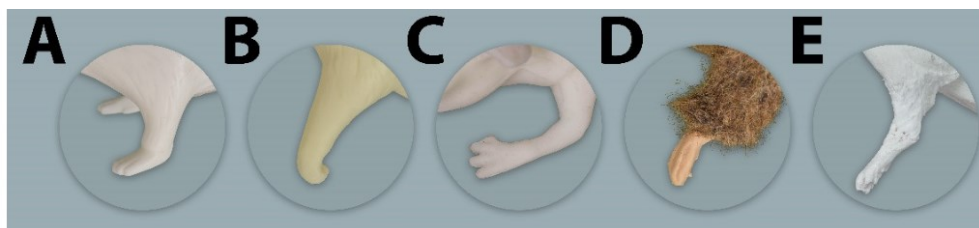
Per tutti i simulatori, la coda è stata percepita come la più realistica tra tutte le parti. La valutazione si è basata su diversi aspetti, tra cui la lunghezza e le proporzioni rispetto al corpo, la flessibilità, la qualità della superficie e anche quanto la coda del simulatore si comportasse in modo realistico durante le tecniche pratiche, come il contenimento o le procedure sulla vena caudale. In particolare, il punteggio migliore relativo alla coda è stato ottenuto dal modello B.



*Figura 2.3.8: Dettaglio dell'innesto della coda nei simulatori A-E [28]*

L'aspetto generale del corpo è stato giudicato discretamente realistico, sebbene siano emerse discrepanze nelle proporzioni e nella consistenza dei materiali. Le principali criticità riguardano gli arti e la testa.

Gli arti di tutti simulatori sono stati giudicati poco aderenti alla realtà anatomica del ratto vivo perché caratterizzati da una mobilità limitata e scarsa capacità di mantenere una postura stabile ed eretta. In particolare, il modello C è risultato quello meno accurato, soprattutto per quanto riguarda l'aspetto generale, la resa tattile e la postura.



*Figura 2.3.9: Dettaglio degli arti superiori nei simulatori A-E [28]*

La testa è stata identificata come la regione meno realistica in assoluto. In molti modelli, infatti, si riscontra una scarsa definizione delle strutture anatomiche, una rigidità eccessiva e l'assenza di elementi chiave quali mandibola, lingua e cavità orale. Tali mancanze limitano l'addestramento a procedure come la somministrazione orale. Sebbene complessivamente poco realistica, la testa risultata relativamente meglio rappresentata è quella del modello E.

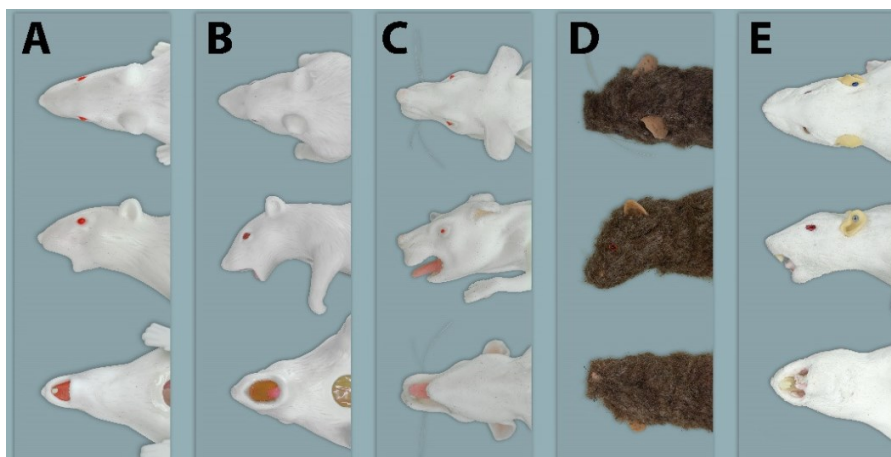


Figura 2.3.10: Dettaglio della testa nei simulatori A-E [28]

Al termine dell'analisi, il simulatore A è risultato complessivamente il più realistico tra i modelli esaminati; seguono i simulatori B ed E, mentre C e D si collocano a pari merito in ultima posizione.

Negli studi [40] e [41] vengono valutati gli stessi simulatori A-E, ma in relazione al loro impiego nei corsi di specializzazione in scienze degli animali da laboratorio. In entrambi i lavori sono state considerate le principali procedure di laboratorio, tra cui manipolazione, contenimento, somministrazione (orale, endovenosa a livello della vena caudale, sottocutanea e intramuscolare), prelievi ematici (dalla vena caudale, dalla vena safena e dal cuore) e marcatura auricolare. Non tutti i simulatori permettono l'esecuzione dell'intero set di procedure: alcune tecniche, come il prelievo dalla vena safena o la puntura cardiaca, sono limitate al modello C; mentre altre, quali manipolazione, contenimento e somministrazione endovenosa tramite vena caudale, sono comuni a tutti i modelli.

Nel caso dello studio basato sulla prospettiva degli studenti partecipanti ai corsi, tali tecniche sono state testate in ambito pratico. Le principali criticità riguardano il realismo tattile e la trasferibilità delle competenze al modello *in vivo*. Alcune procedure risultano meno riproducibili, come la somministrazione orale nel modello E, a causa della limitata accuratezza anatomica della cavità orale, e le tecniche di manipolazione e contenimento nei simulatori C e D, per via dei materiali utilizzati. Sebbene i simulatori siano ritenuti utili come strumento di supporto nelle fasi iniziali dell'apprendimento, soprattutto per i soggetti inesperti, nessuno di essi è risultato in grado di sostituire completamente l'animale *in vivo* [40].

Nello studio condotto dal punto di vista dei *trainer* e supervisori, l'analisi si concentra sull'adeguatezza complessiva dei simulatori e sulla loro integrazione nei corsi specialistici. È emerso che il loro utilizzo nei corsi risulta limitato, principalmente a causa delle criticità riportate sopra, che ne riducono l'implementazione didattica e la conformità agli standard formativi richiesti [41].

Nel complesso, i simulatori attualmente disponibili sono considerati strumenti utili, ma non ancora pienamente adeguati, rendendo necessari ulteriori sviluppi per migliorarne l'applicabilità come alternativa all'impiego di animali vivi nell'ambito della formazione.

### 3. Materiali e metodi di realizzazione

Nel progetto di tesi, lo sviluppo del simulatore di ratto è partito dalla realizzazione delle due vene laterali della coda, ottenute in lattice mediante processo di *dipping*. Tale approccio consente la produzione di strutture tubolari sottili ed elastiche, idonee a modellizzare i vasi sanguigni. Successivamente le vene sono state inserite all'interno della struttura che modellizza la coda, realizzata mediante la tecnica di manifattura additiva *Material Jetting*, in grado di riprodurre le diverse strutture e proprietà meccaniche dei tessuti presenti nell'anatomia del ratto.

#### 3.1 Dipping

Il lattice naturale (*Natural Rubber Latex*, NRL) è una materia prima di origine vegetale d'interesse nel campo dei biomateriali. Viene estratto dall'albero della gomma (*Hevea brasiliensis*) ed è definito come una dispersione colloidale di particelle di gomma in un mezzo acquoso, caratterizzata da un colore bianco lattiginoso. Ogni particella è rivestita da una struttura di natura fosfolipoproteica che contribuisce alla stabilità colloidale, impedendo l'aggregazione delle particelle.

Circa il 50-60% del lattice è composto da acqua. La frazione restante è composta da:

- poli(cis-1,4-isoprene) (per circa il 96%), un polimero ad alto peso molecolare, ottenuto per reazione di polimerizzazione dell'isoprene, come riportato in *Figura 3.1.1*;
- proteine (per circa l'1-2%);
- molecole lipidiche (circa 0,4-1% per i lipidi neutri e 0,5-0,6% per quelli polari);
- componenti inorganici in piccole tracce (circa 0,4-0,6%), come magnesio, ferro, potassio e zinco, in grado di influenzare le proprietà chimico-fisiche e la reattività del lattice.

Circa il 75% delle proteine è disciolto nella frazione sierica, mentre la restante parte, insieme a lipidi e acidi grassi a catena lunga, è adsorbita sulla superficie delle particelle di gomma, formando un rivestimento che ostacola la coalescenza attraverso effetti sia sterici sia elettrostatici e garantisce la stabilità del sistema colloidale. Tuttavia, le proteine possono essere responsabili di fenomeni allergenici, rendendo necessaria la loro rimozione o modifica nei processi destinati ad applicazioni biomedicali. Le particelle di gomma disperse nel mezzo

acquoso presentano dimensioni variabili (5-3000 nm). Il lattice naturale possiede una densità di circa 0,98 g/cm<sup>3</sup> e un pH quasi neutro, compreso tra 6,5 e 7,0 [42].

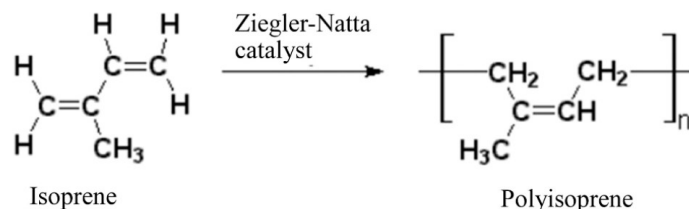


Figura 3.1.1: Reazione di polimerizzazione per addizione dell'isoprene che, in presenza di catalizzatori Ziegler-Natta, porta alla formazione del poli(cis-1,4-isoprene) [43]

La presenza del polimero poli(cis-1,4-isoprene) conferisce comportamento viscoelastico, proprietà di isolamento, di impermeabilità ed elevata deformabilità. Queste caratteristiche rendono il lattice naturale e il suo derivato solido, la gomma naturale (*Natural Rubber, NR*), materiali versatili, largamente impiegati in ambito tecnologico e biomedicale. Un esempio classico è la produzione di guanti usati in ambito sanitario, progettati per garantire al contempo protezione e comfort durante l'impiego. Come schematizzato in *Figura 3.1.2*, il lattice naturale trova applicazione anche nella realizzazione di dispositivi biomedicali più avanzati, come membrane, medicazioni, scaffold per l'ingegneria tissutale e sistemi transdermici e di *drug delivery*, grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità e alla capacità di favorire processi di angiogenesi e rigenerazione tissutale [44].

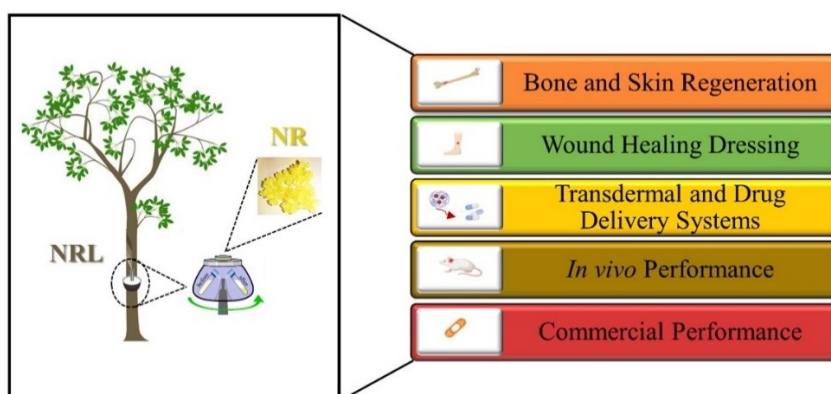


Figura 3.1.2: Schema rappresentativo del lattice naturale (NRL) estratto da *Hevea brasiliensis* e della sua trasformazione in gomma naturale (NR) in seguito a centrifugazione, e indicazione delle sue principali applicazioni in ambito biomedicale [44]

Oltre alla gomma naturale, esiste un'ampia classe di elastomeri di origine artificiale, indicati come gomme sintetiche. Questi materiali vengono prodotti attraverso reazioni di polimerizzazione per condensazione di monomeri insaturi e sono stati sviluppati con l'obiettivo di superare alcune limitazioni intrinseche della gomma naturale, mantenendo proprietà meccaniche simili. In generale, le gomme sintetiche offrono una migliore stabilità termica e una maggiore resistenza all'invecchiamento e agli agenti chimici. Per tale motivo, il lattice sintetico è impiegato nella fabbricazione di guanti protettivi resistenti a oli, solventi e sostanze chimiche, schiume tecniche, vernici e rivestimenti impermeabili per l'edilizia e materiali per l'industria automobilistica. Inoltre, le gomme sintetiche risultano meno allergeniche, in quanto prive delle proteine presenti nel lattice naturale. Tuttavia, la gomma naturale si distingue per proprietà meccaniche superiori quali maggiore elasticità, resistenza a trazione, resilienza e allungamento a rottura. Ulteriori vantaggi sono l'abbondanza della materia prima e il basso costo [43].

Per mantenere stabile il lattice durante il trasporto e lo stoccaggio, vengono aggiunti conservanti come l'idrossido di ammonio, che innalzano il pH del sistema fino a valori intorno a 10,5 [43]. In condizioni basiche le componenti superficiali delle particelle di gomma si ionizzano formando gruppi carbossilato ( $-\text{COO}^-$ ), che conferiscono una carica negativa, generando una repulsione elettrostatica che impedisce l'aggregazione delle particelle e garantisce la stabilità colloidale. Tuttavia, l'impiego dell'ammoniaca come conservante presenta alcune criticità: è altamente volatile, può irritare le vie respiratorie e comporta rischi per la salute degli operatori, oltre a contribuire a problemi di inquinamento. Per questo motivo negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse verso sistemi di conservazione alternativi privi di ammoniaca, più sicuri e sostenibili [45]. In base al contenuto di ammoniaca il lattice può essere classificato in due principali tipologie: lattice ad alto contenuto di ammoniaca (*High Ammonia*, HA) e lattice a basso contenuto di ammoniaca (*Low Ammonia*, LA). Poiché l'ammoniaca svolge anche una funzione battericida, nel caso del lattice LA è necessario aggiungere altri agenti conservanti per prevenire la proliferazione di microrganismi e garantirne la stabilità [46].

La caratterizzazione del lattice si basa su una serie di parametri che ne descrivono la composizione e le proprietà. Tra questi, il *Total Solids Content* (TSC) rappresenta la percentuale in massa di materiale solido non volatile presente nella dispersione. Tale parametro viene

determinato tramite l'essiccazione in forno di una quantità nota di un campione di lattice (a 70 °C per 16 ore o a 105 °C per 2 ore), secondo la norma ISO 124:2014, ed è calcolato come:

$$TSC = \frac{W_{finale}}{W_{iniziale}} \times 100$$

dove  $W_{iniziale}$  è la massa del campione prima dell'essiccazione e  $W_{finale}$  è la massa del residuo secco [47].

Il TSC comprende la frazione di gomma secca, definita come *Dry Rubber Content* (DRC), e la frazione non gommosa, indicata come *Non-Rubber Content* (NRC). Il DRC quantifica il contenuto di gomma ed è un parametro importante ai fini della classificazione commerciale del materiale [48]. Nel lattice naturale grezzo, il DRC è generalmente compreso tra il 25% e il 50% in peso. Tale valore può essere aumentato fino a circa il 60% mediante processi di centrifugazione, *creaming* o evaporazione, ottenendo in questo modo un lattice concentrato, adatto alla fabbricazione di prodotti [43]. La determinazione del DRC viene effettuata secondo la norma ISO 126:2005, che prevede la coagulazione del lattice mediante acido, la separazione della fase solida, seguita da pressatura ed essiccazione del campione a 70 °C per almeno 16 ore. Il parametro NRC, invece, comprende le componenti non polimeriche (proteine, lipidi e altre sostanze), il cui contributo è indicativo del grado di purezza del materiale [48].

Il lattice si presenta come una dispersione acquosa ma, a seguito di coagulazione, essiccazione e vulcanizzazione, forma un film polimerico continuo, uniforme ed elastico. Questa capacità lo rende un materiale idoneo al processo di *dipping*, che rappresenta il metodo più diffuso per la produzione di manufatti in lattice a ridotto spessore, come i guanti medicali.

Il processo è costituito da una sequenza di fasi controllate, illustrate in *Figura 3.1.3*, e ha inizio con la preparazione dello stampo (*former*), generalmente realizzato in ceramica o metallo, che viene preventivamente pulito e, in molti casi, preriscaldato per favorire l'adesione del materiale. Lo stampo è progettato con la geometria del manufatto che si intende ottenere; ad esempio, nel caso dei guanti, esso riproduce la forma di una mano. Lo stampo viene dapprima immerso in una soluzione coagulante di natura elettrolitica. Tale soluzione, generalmente costituita da nitrato di calcio disciolto in acqua, ha lo scopo di favorire la successiva coagulazione del lattice sulla superficie dello stampo. Dopo l'estrazione dello stampo dalla soluzione coagulante, il solvente viene lasciato evaporare, così da consentire la formazione di uno strato concentrato di coagulante sulla superficie dello stampo. A questo punto, avviene l'immersione nella

dispersione di lattice. Gli ioni del coagulante presenti sulla superficie dello stampo destabilizzano la dispersione colloidale, favorendo l'aggregazione delle particelle [43]. Di conseguenza, quando lo stampo viene estratto, il lattice coagula sulla superficie dello stampo formando un film ricco di acqua, noto come *wet gel*. Lo spessore di tale strato gelificato dipende da parametri operativi quali il tempo di immersione e la viscosità del lattice [49]. Dopo che lo stampo viene estratto dal bagno di lattice, vi è una fase di sgocciolamento, durante la quale l'eccesso di materiale viene rimosso per gravità e la struttura del film inizia a stabilizzarsi. Successivamente lo stampo viene trasferito in un forno ad una temperatura controllata in modo da far essiccare il *wet gel* mediante evaporazione dell'acqua contenuta in esso. Facoltativamente, prima che il film sia completamente asciutto, lo stampo può essere rimosso dal forno e immerso in acqua calda per pochi secondi. Questo trattamento, noto come *leaching*, ha lo scopo di rimuovere specie idrosolubili, come proteine, Sali e residui chimici, migliorando così la qualità e la biocompatibilità del prodotto. Successivamente si procede con la vulcanizzazione, che conferisce al materiale le proprietà meccaniche ed elastiche finali attraverso la reticolazione delle catene polimeriche. Il film ottenuto viene raffreddato, eventualmente sottoposto a trattamenti superficiali e, infine, rimosso dallo stampo, ottenendo il manufatto finale. Spesso, per facilitare la rimozione dello stampo il film viene rivestito con polvere, come ad esempio amido di mais, che impedisce al film di attaccarsi su sé stesso [50].

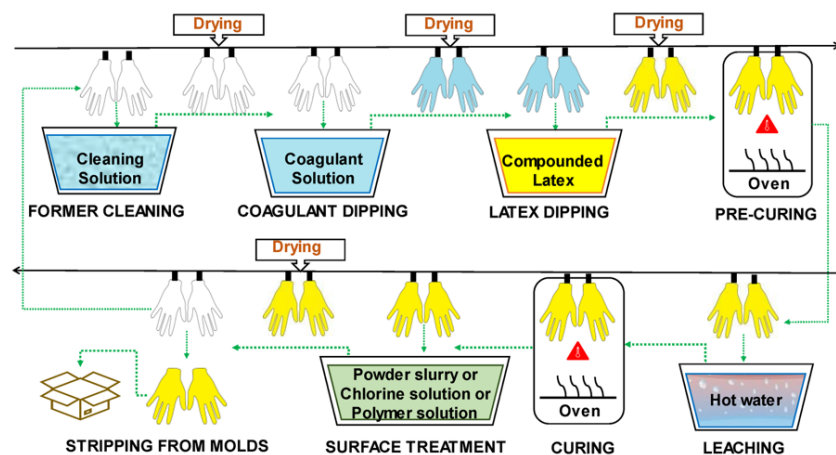


Figura 3.1.3: Schema delle fasi di produzione dei guanti medicali mediante dipping [50]

## 3.2 Material Jetting

Con il termine manifattura additiva, introdotto dall'*American Society for Testing and Materials* (ASTM) attraverso il *Committee F42 on Additive Manufacturing Technologies*, si indica un insieme di processi produttivi che consentono di ottenere oggetti tridimensionali a partire da un modello digitale. A differenza delle tecniche sottrattive, la costruzione avviene mediante l'aggiunta progressiva di materiale secondo un approccio *layer-by-layer*, ovvero strato su strato. Il modello digitale tridimensionale viene suddiviso in una serie di strati bidimensionali e la stampante 3D realizza il componente costruendolo uno strato alla volta, seguendo istruzioni che guidano la deposizione e la successiva solidificazione del materiale. Questo principio di costruzione è comune a tutte le tecnologie di manifattura additiva, mentre ciò che le differenzia è il modo in cui ciascun strato viene realizzato, in funzione del materiale e del processo adottato. Tra le tecnologie di manifattura additiva rientra il processo di *Material Jetting* (MJ), noto anche con le denominazioni commerciali PolyJet™ e MultiJet™, adottate rispettivamente dalle aziende Stratasys e 3D Systems. Questa tecnologia di stampa 3D è definita dalla norma ISO/ASTM 52900:2021 come il processo in cui un materiale fotopolimerico liquido viene depositato selettivamente sotto forma di micro-gocce [51].

La *Figura 3.2.1* mostra il funzionamento della tecnologia MJ, indicando tutte le sue componenti. Il materiale, contenuto in un serbatoio, viene convogliato verso la testina di stampa, dotata di piccoli ugelli (*nozzle*), attraverso cui viene erogato, in modo analogo alle stampanti a getto d'inchiostro (*inkjet*). In alcuni sistemi è presente un dispositivo di livellamento, come una lama o un rullo, che ha lo scopo di uniformare lo strato depositato, garantendo uno spessore costante. La solidificazione avviene per effetto della reticolazione indotta da una sorgente luminosa ultravioletta, che agisce contestualmente o immediatamente dopo la deposizione. Una volta completata la polimerizzazione di uno strato, il piatto di stampa si abbassa di una quantità pari allo spessore dello strato, consentendo la deposizione di nuovo materiale sul livello precedente. Il ciclo di deposizione e polimerizzazione si ripete in modo continuo e controllato fino alla completa formazione della struttura tridimensionale, garantendo elevate velocità di produzione e una risoluzione fino a 14  $\mu\text{m}$  [52]. Poiché nella MJ vengono impiegati materiali liquidi, è necessario generare una struttura di supporto per sostenere le porzioni non autoportanti del componente durante la fase di stampa. I materiali di supporto, di natura gelatinosa, sono depositati contestualmente al materiale strutturale mediante una seconda

testina. Al termine del processo, essi possono essere rimossi manualmente o mediante getti d'acqua ad alta pressione o trattamenti in soluzioni specifiche, come soluzioni alcaline a base di idrossido di sodio. La progettazione dei supporti, così come l'orientamento e la posizione del pezzo sul piano di stampa, influenzano la qualità superficiale del componente, i tempi di produzione e il consumo di materiale ([53], [54]).

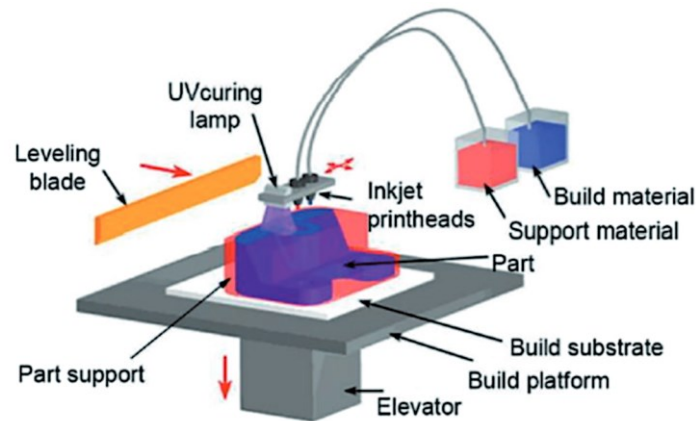


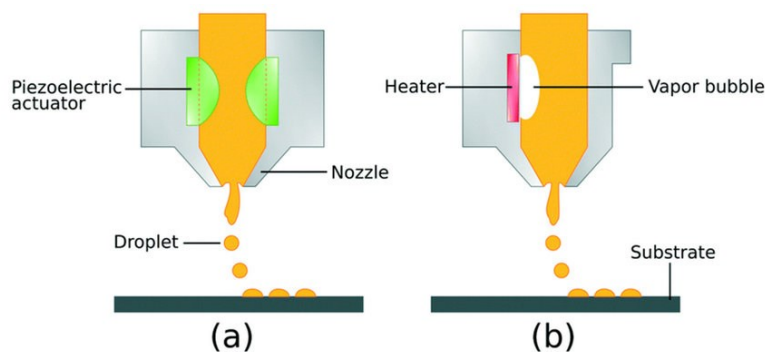
Figura 3.2.1: Illustrazione della stampante 3D Material Jetting con tutte le sue componenti [54]

Le proprietà reologiche del materiale influenzano la fase di deposizione, rendendola uno degli aspetti più critici del processo. In particolare, i materiali utilizzati devono presentare viscosità relativamente basse alle condizioni operative, in quanto valori più elevati rendono difficile l'espulsione controllata del materiale dagli ugelli, mentre viscosità troppo basse compromettono la stabilità della goccia dopo la deposizione. La viscosità può essere modulata mediante riscaldamento del materiale o attraverso opportune formulazioni chimiche. Ulteriori proprietà rilevanti sono la tensione superficiale e il comportamento pseudoplastico (*shear-thinning*), che influenzano la dinamica di formazione e distacco delle gocce. L'ugello rappresenta l'elemento centrale del sistema di deposizione. La sua dimensione è strettamente correlata alle condizioni operative: al diminuire del diametro dell'ugello, è necessario aumentare la pressione di esercizio per estrarre un materiale di data viscosità, ma pressioni elevate rendono più complesso il controllo della formazione delle gocce ([53], [54]).

Le modalità di deposizione possono essere distinte in due diversi approcci: *continuous mode* e *drop-on-demand* (DoD). Nel *continuous mode*, il materiale viene erogato sotto forma di flusso continuo che successivamente viene suddiviso in gocce singole; queste vengono caricate

eletttricamente e successivamente deviate mediante campi elettrici, consentendo di indirizzare solo le gocce necessarie verso il substrato e recuperare quelle in eccesso. Questo approccio è meno utilizzato rispetto al metodo DoD, che rappresenta la soluzione più diffusa nelle tecnologie MJ commerciali perché consente una deposizione più efficiente e precisa. In questo caso, le gocce vengono generate solo quando richiesto, tramite impulsi controllati che attivano un attuatore, che regola il rilascio delle singole gocce su un substrato in movimento.

Nel caso del metodo DoD, le testine di stampa possono essere di tipo termico o piezoelettrico (*Figura 3.2.2*). Le prime sfruttano la formazione di bolle di vapore generate per riscaldamento, che spingono il materiale fuori dall'ugello, ma risultano meno impiegate a causa della difficoltà nel controllo del processo e dei problemi legati all'umidità. Le testine piezoelettriche, invece, sono le più utilizzate. Esse sono basate su materiali piezoceramici e permettono un controllo preciso dell'espulsione delle gocce a frequenze elevate, senza indurre variazioni termiche significative nel materiale ([54], [55]).



*Figura 3.2.2: Illustrazione delle testine inkjet DoD: (a) modalità piezoelettrica, (b) modalità termica [55]*

L'accuratezza del processo dipende da molteplici fattori, tra cui la risoluzione lungo l'asse Z (legata allo spessore degli strati e al movimento del piano di stampa) e nel piano X-Y (determinata dalla dimensione minima delle gocce e dalla precisione della testina). La figura *Figura 3.2.3* illustra il sistema di deposizione nella MJ, evidenziando il movimento della testina lungo gli assi X-Y e della piattaforma lungo l'asse Z. Ulteriori influenze derivano dalle proprietà del materiale, dalle condizioni ambientali, tra cui temperatura, umidità e vibrazioni, e dai parametri di processo, come l'intensità della radiazione UV e le modalità di livellamento. Rispetto ad altre tecnologie additive basate sulla fotopolimerizzazione, come la stereolitografia, la tecnica MJ presenta una maggiore stabilità geometrica, con una riduzione dell'effetto di

deformazione (*curl distortion*) dovuto al minor ritiro del materiale. Ciò consente la produzione di componenti anche di grandi dimensioni, mantenendo un'elevata accuratezza dimensionale (tipicamente dell'ordine dello 0,1%) [53].

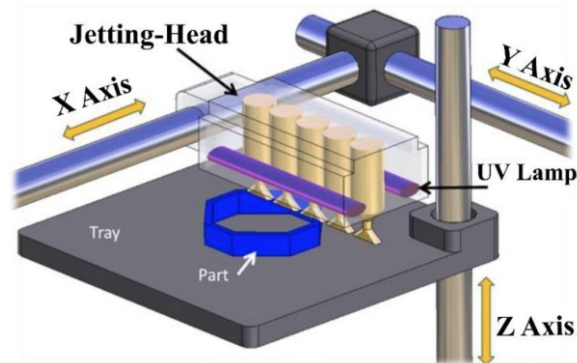


Figura 3.2.3: Assi X, Y e Z nella MJ [53]

Uno dei principali vantaggi della tecnologia MJ è la possibilità di depositare simultaneamente più materiali, consentendo la realizzazione di componenti multimateriale e multicromia, anche con variazioni locali delle proprietà meccaniche. La miscelazione controllata di più fotopolimeri permette di ottenere i cosiddetti *Digital Materials* (DMs), grazie ai quali è possibile modulare proprietà quali rigidità, trasparenza e durezza (solitamente espressa tramite scala Shore). Per tale motivo, in ambito biomedicale, la tecnologia MJ trova applicazione nella realizzazione di modelli anatomici ad alta fedeltà, utilizzati sia per la pianificazione chirurgica sia per il *training* medico. Essa consente di riprodurre la geometria e le proprietà meccaniche dei tessuti biologici, permettendo di ottenere differenti consistenze tissutali all'interno dello stesso modello grazie alla stampa multimateriale ([51], [52]).

### 3.2.1 Stratasys J750 Digital Anatomy

La stampante 3D impiegata per la realizzazione dei modelli, presso il laboratorio ProtoLab dell'Università di Pavia, è la Stratasys J750 Digital Anatomy (*Figura 3.2.1.1*). La stampante si basa sulla tecnologia PolyJet™, sviluppata da Objet Geometries Ltd. nel 2000 e in seguito acquisita da Stratasys nel 2012 [53]. Presenta dunque tutte le componenti descritte

precedentemente per la tecnologia MJ, tra cui testina di stampa, sorgente di luce UV e piatto di stampa. Le principali specifiche tecniche della stampante sono riportate nella *Tabella 1* [56].

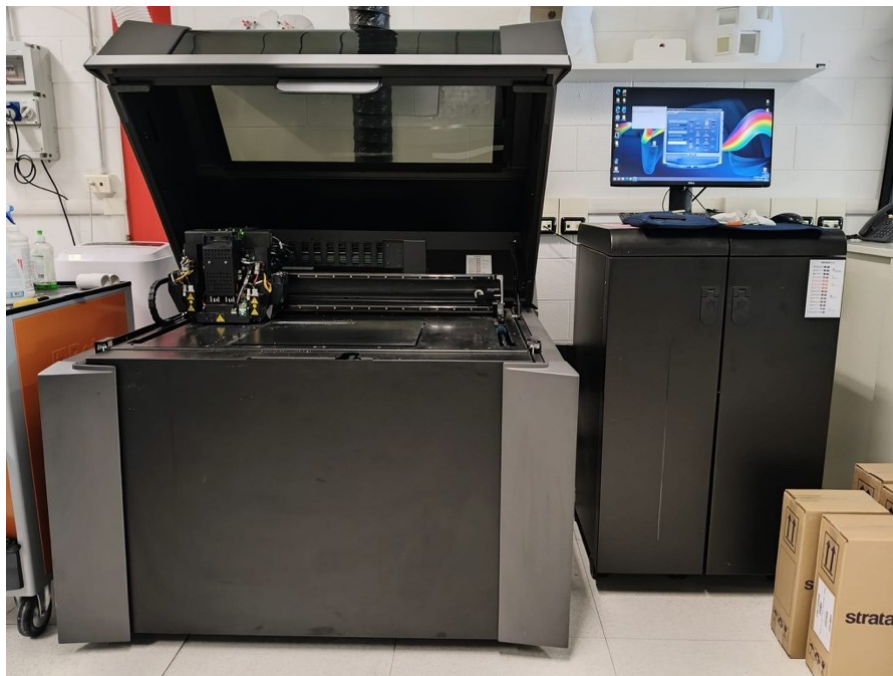


Figura 3.2.1.1: Stampante Stratasys J750 Digital Anatomy del laboratorio ProtoLab

Tabella 1: Specifiche di prodotto della stampante Stratasys J750 Digital Anatomy [56]

Tecnologia di stampa	PolyJet™
Materiali del modello	Vero™: famiglia di materiali opachi (colori neutri o vivaci) VeroClear™ / VeroUltraClear™: materiali trasparenti Agilus30™, TangoPlus™ / TangoBlackPlus™: materiali flessibili TissueMatrix™, BoneMatrix™: materiali <i>Digital Anatomy</i> Biocompatible Clear: materiale biocompatibile
<i>Digital materials</i>	Oltre 500.000 colori Digital ABS Plus™ / Digital ABS2 Plus™: materiali con proprietà simil-ABS Materiali simil-gomma con diversi valori Shore A Materiali ultra-morbidi (Shore 00) Colorazioni traslucide Materiali personalizzati tramite GrabCAD Voxel Print™

Materiali di supporto	GelMatrix™ (rimovibile con idrogetto): materiale <i>Digital Anatomy</i> SUP705™ (rimovibile con idrogetto) SUP706B™ (solubile)
Dimensioni e peso	Stampante: 1400 × 1260 × 1100 mm; 430 kg <i>Material Cabinet</i> : 670 x 1,170 x 640 mm; 152 kg
Volume di stampa ( <i>build size</i> )	490 × 390 × 200 mm
Spessore <i>layer</i>	<i>Layer</i> orizzontali fino a 14 µm
Modalità di stampa	<i>High Speed</i> (fino a 3 materiali, risoluzione: 27 µm) <i>High Quality</i> (fino a 6 materiali, risoluzione: 14 µm) <i>High Mix</i> (fino a 6 materiali, risoluzione: 27 µm)
Accuratezza dimensionale	Definita come deviazione dalle dimensioni STL, per modelli stampati con materiali rigidi, a seconda delle dimensioni: - <100 mm: ±100 µm - >100 mm: ±200 µm o ±0,06% della lunghezza del componente (assumendo il maggiore)
Condizioni operative	Temperatura: 18-25 °C; Umidità relativa: 30-70%
Alimentazione	100-120 V (13,5 A) / 220-240 V (7 A), 50-60 Hz
Certificazioni	CE, FCC, EAC
Sistema operativo	Windows 7 e 8.1
Connettività	LAN (TCP/IP)
Software	GrabCAD Print Digital Anatomy (+ GrabCAD Voxel Print)

La stampante in esame permette l'utilizzo di diversi materiali fotopolimerici, tra cui materiali *Digital Anatomy* progettati per riprodurre in modo realistico le proprietà meccaniche di specifici tessuti biologici. Di seguito sono riportate le principali caratteristiche dei materiali impiegati nel progetto:

- Famiglia Vero™: fotopolimeri rigidi e versatili, impiegati principalmente per la realizzazione di modelli visivi e prototipi, al fine di distinguere visivamente diverse componenti. Grazie alla loro rigidità, risultano adatti per prove funzionali in condizioni di carico limitato. Sono disponibili in diverse colorazioni, mantenendo proprietà meccaniche simili. Alcune varianti offrono caratteristiche specifiche, come colori più intensi (materiali VeroVivid™) o trasparenza, utile per la visualizzazione di strutture interne (VeroClear™ e VeroUltra™Clear) [57].

- Agilus30<sup>TM</sup>: fotopolimero elastomerico caratterizzato da elevata resistenza allo strappo e capacità di sopportare flessioni e deformazioni ripetute. Si tratta di un materiale simil-gomma, ideale per la prototipazione rapida e la verifica di progetto, in grado di simulare l'aspetto, la risposta tattile e il comportamento di componenti elastici. Presenta una durezza pari a Shore A 30 nelle varianti trasparente, bianco e nero [58].
- TissueMatrix<sup>TM</sup> (MED310): fotopolimero più morbido attualmente disponibile per la stampa 3D, progettato per replicare l'aspetto e la risposta meccanica di strutture biologiche sotto sollecitazione, quali miocardio e fegato. A causa della sua elevata adesività e della limitata stabilità, non può essere stampato come materiale puro, ma solo in combinazione con materiali più stabili, come Agilus30<sup>TM</sup>. Il materiale presenta un aspetto traslucido ( [56], [59]).
- GelMatrix<sup>TM</sup> (FLG110): materiale traslucido e gelatinoso, impiegato per simulare tessuti molli, come il tessuto adiposo sottocutaneo e quello epatico, e come materiale di supporto (GelSupport<sup>TM</sup>) per cavità di piccole dimensioni, ad esempio nei vasi sanguigni, facilmente rimovibile mediante getto d'acqua. L'elevata morbidezza e instabilità del materiale comportano proprietà meccaniche non costanti e ne impediscono l'impiego come materiale strutturale puro nella simulazione dei tessuti, rendendo necessaria la combinazione con materiali più stabili, come Agilus30<sup>TM</sup> ( [56], [60]).
- BoneMatrix<sup>TM</sup> (RGD516): materiale progettato per la simulazione di strutture ossee, in grado di riprodurre la struttura porosa e il comportamento meccanico. Presenta elevata resistenza associata a una limitata flessibilità e capacità di mantenere la forma, permettendo di ottenere modelli con caratteristiche simili anche ai tessuti associati, come legamenti e tessuti fibrotici, e di simulare procedure chirurgiche ( [56], [61]).

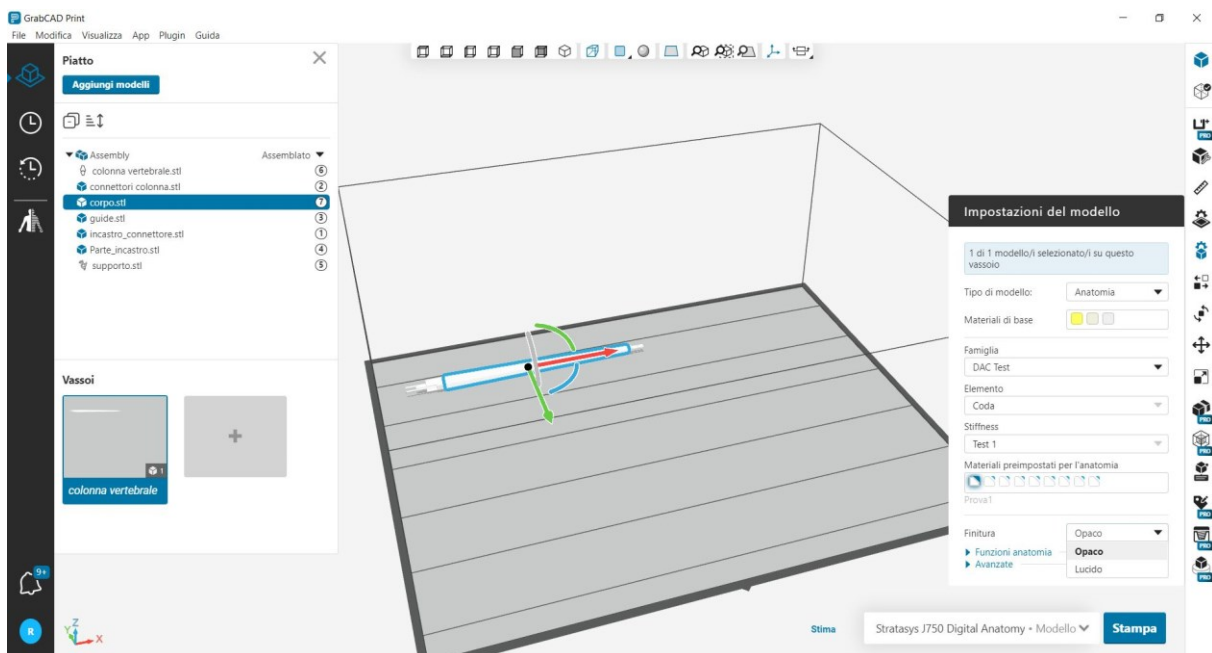
Sono inoltre disponibili *preset* di *digital materials* predefiniti, costituiti da varie combinazioni dei materiali base. Attraverso il software GrabCAD Print è possibile creare e salvare ulteriori *preset* personalizzati, regolando le proprietà del materiale e i parametri di stampa in funzione dell'applicazione desiderata.

### 3.2.2 Software GrabCAD

Il software GrabCAD Print, sviluppato da Stratasys, consente di gestire l'intero processo di stampa, includendo sia il monitoraggio e la pianificazione dei lavori, sia la configurazione delle impostazioni di stampa, tra cui l'assegnazione dei materiali e la disposizione degli oggetti sul piatto di stampa [62].

All'apertura del software, l'interfaccia mostra al centro il piatto di stampa, rappresentato come un piano 2D, sul quale vengono posizionati i modelli caricati. I file possono essere importati singolarmente oppure come assieme (*assembly*), nel caso in cui l'oggetto finale sia composto da più parti separate, come nel caso in esame, mostrato in *Figura 3.2.2.1*. L'importazione come *assembly* permette di trattare i diversi componenti come un unico modello, mantenendo comunque la possibilità di intervenire sulle singole parti.

Nella sezione in basso a destra (*Figura 3.2.2.1*) è possibile selezionare la stampante da utilizzare o connettersi a un dispositivo tramite indirizzo IP. Le stampanti sono suddivise per tipologia e, a seconda della scelta, vengono aggiornati il piatto di stampa e le impostazioni.



*Figura 3.2.2.1: Interfaccia del software GrabCAD*

Tramite le icone nella barra laterale destra (*Figura 3.2.2.1*), è possibile modificare le impostazioni del piatto di stampa e del modello, correggendo eventuali errori della *mesh*,

ridimensionandolo e orientandolo correttamente. Tra queste vi è la sezione “Impostazioni modello” che permette di assegnare il materiale e di scegliere l’opzione di finitura superficiale, opaca o lucida, a seconda dell’applicazione del materiale di supporto. Nel caso della finitura opaca, il materiale di supporto viene applicato su tutta la superficie del modello, determinando un aspetto completamente opaco. Al contrario, con la finitura lucida, il materiale di supporto viene depositato solo dove necessario dal punto di vista strutturale, ad esempio in presenza di geometrie sporgenti. Di conseguenza la superficie del modello risulta prevalentemente lucida, ad eccezione delle aree a contatto con il supporto, che appaiono opache. Tale modalità riduce i tempi di *post-processing* e utilizza una quantità minore di materiale, risultando quindi più economica, ma può comportare una finitura meno omogenea e un leggero arrotondamento degli spigoli vivi.

Il materiale del modello determina proprietà come colore, trasparenza e comportamento meccanico dell’oggetto. È possibile selezionare un *preset* tra quelli disponibili oppure crearlo tramite il modulo *Digital Anatomy Creator* (DAC), selezionando l’icona apposita nella barra laterale sinistra dell’interfaccia (*Figura 3.2.2.1*).

Dopo aver caricato un file .STL, è possibile accedere al DAC (*Figura 3.2.2.2*), che gestisce l’organizzazione interna del modello. In questa sezione, il modello viene suddiviso in strati, tra cui uno esterno (*Outer layer*) e uno interno (*Background*), ai quali si possono aggiungere ulteriori *layer* intermedi. Ogni *layer* può essere definito in termini di posizione, spessore e materiale, permettendo così di creare oggetti con proprietà variabili all’interno della stessa geometria.

Per ciascun *layer* è possibile scegliere una specifica funzione di distribuzione del materiale, approfondite in *Tabella 2*. Queste funzioni controllano il modo in cui il materiale viene depositato all’interno del volume, influenzando le proprietà meccaniche del pezzo, come rigidità, elasticità e densità.

La *shell* caricata può essere esplorata visivamente scorrendo i *layer*, grazie al cursore laterale sulla destra (*Figura 3.2.2.2*), che consente di osservare la distribuzione dei materiali preimpostati. Inoltre, è possibile gestire la transizione tra i vari *layer* tramite la funzione *Edge Blending*, che permette di creare passaggi graduali tra materiali diversi, e la funzione *Dynamic Layer Thickness*, che consente di variare lo spessore degli strati lungo il modello.

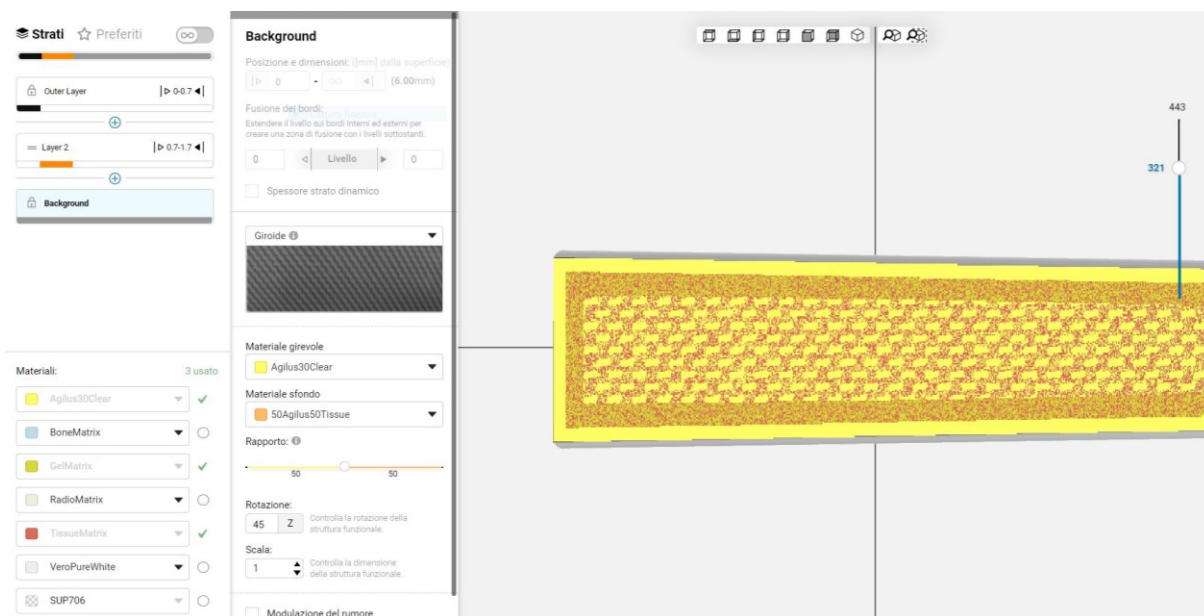
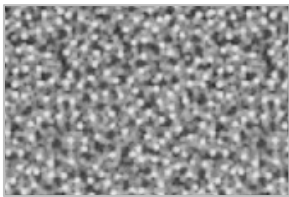
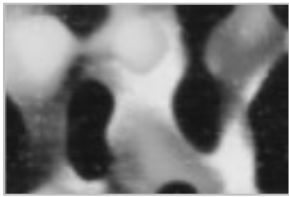
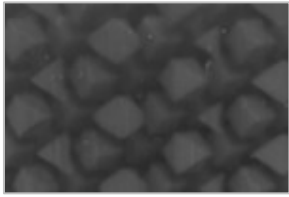
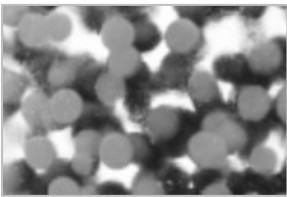



Figura 3.2.2.2: Modulo Digital Anatomy Creator (DAC)

Tabella 2: Caratteristiche delle diverse funzioni di distribuzione del materiale

Funzione	Pattern	Caratteristiche
<i>Digital Material</i>		Distribuzione di gocce casuali e uniformi ottenuta combinando fino a 7 materiali secondo rapporti di miscelazione definiti dall'utente, con possibilità di salvare i materiali personalizzati per usarli in altre funzioni.
<i>Perlin</i>		Miscela di strutture amorfe e continue incapsulate tra di loro, utilizzando fino a 5 materiali. La struttura è controllata tramite soglie e parametro di scala, che determinano rispettivamente la distribuzione dei materiali e la dimensione delle strutture.
<i>Cubes grid</i>		Cubi tridimensionali di un materiale disposti in modo regolare all'interno di un materiale di sfondo differente. I parametri regolabili sono dimensione dei cubi, distanza tra di essi e rotazione.

<i>Scattered spheres</i>		Sfere tridimensionali di un materiale immerse in un materiale di sfondo differente. È possibile controllare la dimensione delle celle, il numero di sfere per cella e la percentuale di volume occupato dalle sfere.
<i>Gyroid</i>		Struttura tridimensionale isotropa con andamento ondulatorio (cella giroide) all'interno di un materiale di sfondo. I parametri modificabili sono il rapporto tra i materiali, la rotazione della struttura e il fattore di scala.

Dopo aver definito il *preset*, è necessario salvarlo con estensione .ADM affinché possa essere utilizzato come materiale associato a una specifica parte del modello. Il file sarà successivamente selezionabile in base alla famiglia, all'elemento e al valore modificatore scelti in fase di creazione del *preset*, come mostrato in *Figura 3.2.2.1*.

Una volta settate le impostazioni desiderate, il software calcola una stima del tempo e dei materiali necessari, in modo da poter valutare la stampa prima di avviarla. Infine, il modello viene inviato alla stampante collegata e il processo può essere monitorato e gestito tramite una sezione dedicata alla pianificazione dei lavori. Questo approccio consente di controllare tutte le fasi della stampa 3D.

### 3.3 Attività sperimentale

L'attività sperimentale si è sviluppata in due fasi principali: una prima fase dedicata alla produzione di modelli di vene in lattice mediante processo di *dipping*, seguita dallo studio dei materiali per la realizzazione della stratificazione della pelle ottenuta tramite tecnologia PolyJet™.

#### 3.3.1 Protocollo di *dipping*

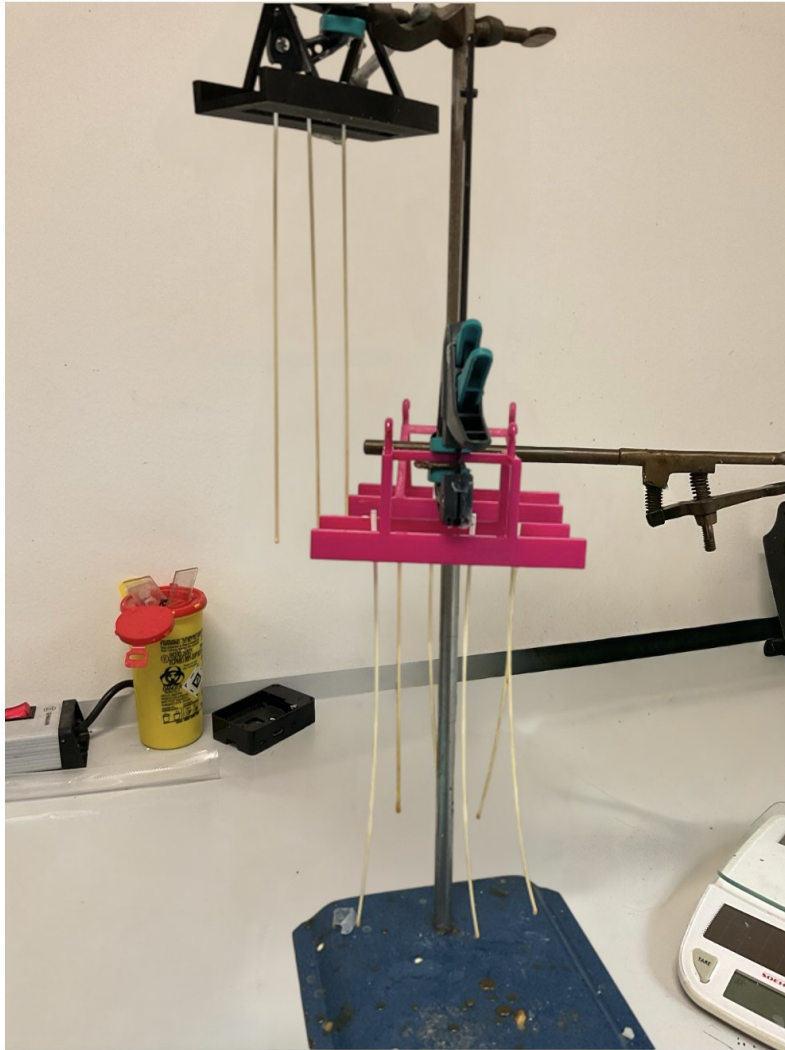
Per la realizzazione delle vene caudali del simulatore ci si è basati su protocolli di *dipping* con lattice reperibili in letteratura, focalizzati sull'ottimizzazione dell'uniformità dello spessore del film, in particolare quello riportato nello studio [63].

Le strutture tubolari sono state ottenute utilizzando un set di stampi realizzati in materiale polimerico rigido (VeroWhite™) tramite la stampante Stratasys J750 Digital Anatomy, approfondita nel sottocapitolo precedente. Nelle prove iniziali gli stampi erano caratterizzati da forma cilindrica leggermente conica, aventi lunghezza pari a 230 mm e diametro variabile da 2 mm (prossimale) a 1,7 mm (distale). Successivamente si è deciso di diminuire il diametro per ottenere vasi con lume inferiore, scegliendo una configurazione non più conica con diametro unico di 1,5 mm. Non è stato possibile ridurre ulteriormente tale valore perché la diminuzione del diametro dello stampo comporta una riduzione della sua rigidità strutturale, fondamentale per garantire la formazione di uno strato uniforme di lattice lungo tutta la superficie. Prove condotte con stampi di diametro pari a 1 mm e 0,5 mm hanno infatti mostrato che la ridotta sezione comporta un'eccessiva flessibilità, impedendo la formazione di una struttura tubolare continua.

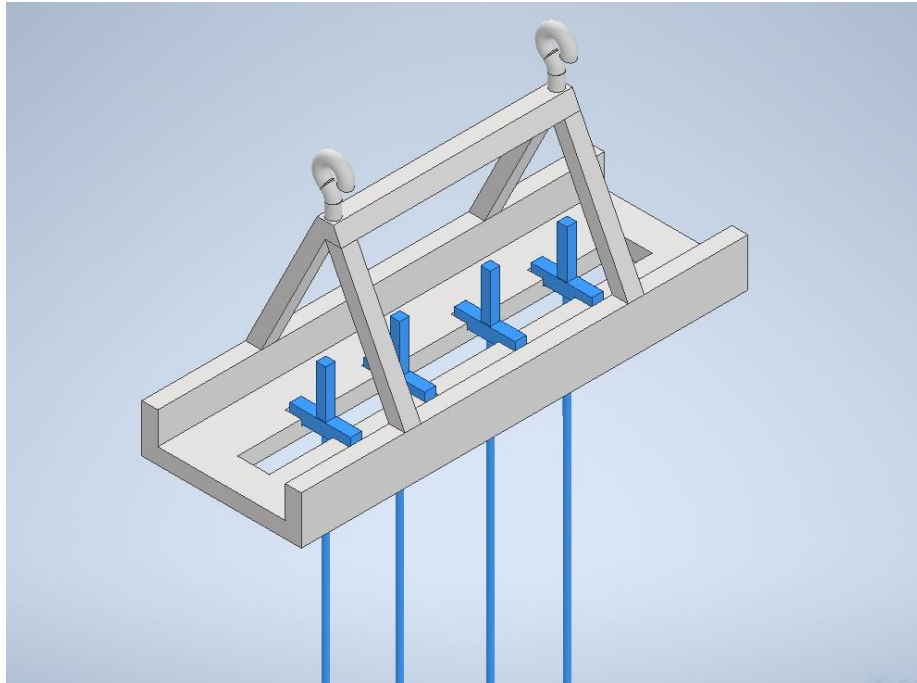
L'estremità prossimale degli stampi presenta una barra che permette il posizionamento in verticale durante la fase di asciugatura successiva all'immersione nel lattice. A tal fine, è stato progettato un apposito supporto con struttura a telaio, in grado di mantenere gli stampi stabili in posizione verticale, permettendo il corretto sgocciolamento del lattice fino a completa asciugatura (*Figura 3.3.1.1*). La barra è stata progettata in modo da facilitare anche la presa dello stampo dal supporto. Il dettaglio delle strutture è raffigurato nella *Figura 3.3.1.2* che mostra l'*assembly* dei file CAD progettati.

È stata progettata anche una vasca di immersione (*Figura 3.3.1.3*), dimensionata in altezza per consentire la completa immersione dello stampo, destinata all'esecuzione del processo di *dipping*.

Il supporto per lo sgocciolamento dei mandrini e la vasca di immersione sono stati realizzati con la stessa tecnologia di stampa 3D e con lo stesso materiale degli stampi (VeroWhite™).



*Figura 3.3.1.1: Stampi appesi in fase di asciugatura dopo l'immersione nel lattice*



*Figura 3.3.1.2: Disegno CAD dell'assembly del supporto con gli stampi appesi*



*Figura 3.3.1.3: Disegno CAD dell'assembly della vasca di immersione (mostrata in trasparenza) con uno stampo al suo interno*

Il lattice utilizzato per le prove sperimentali è un prodotto di marchio Prochima<sup>®</sup>, a base di gomma naturale prevulcanizzata. È stabilizzato con ammoniaca, con un contenuto pari allo 0,6%, additivato con un agente antiossidante e caratterizzato da un TSC del 60,5% [64].

Sono state condotte diverse prove di colata con l'obiettivo di ottenere tubi caratterizzati da uno spessore ottimale, idoneo a simulare i vasi sanguigni della coda di ratto.

In una prima fase sperimentale sono stati analizzati due parametri di processo: TSC e tempo di immersione (*dipping time*). Per valutare l'influenza del TSC, il lattice è stato diluito in modo da ridurre la viscosità mediante l'aggiunta controllata di acqua demineralizzata per ottenere valori di TSC pari al 50% e al 40%. Tuttavia, tale approccio ha prodotto scarsi risultati, in quanto il lattice risultava troppo liquido e non consentiva una formazione uniforme del vaso, anche a seguito di più immersioni. Per quanto riguarda il tempo di immersione, variato nell'intervallo compreso tra 5 s e 20 s, i risultati ottenuti hanno mostrato che tale parametro non influisce in modo significativo sulle caratteristiche del film.



*Figura 3.3.1.4: Confronto tra tubi in lattice ottenuti mediante dipping all'inizio dell'attività sperimentale: i tre campioni a sinistra, realizzati con lattice puro (TSC: 60,5%), risultano integri, mentre gli altri campioni, ottenuti con lattice diluito (TSC: 50%), si sono rotti in fase di sfilamento a causa del ridotto spessore del film*

Nelle prove successive, è stato introdotto lo step di immersione in una soluzione coagulante, precedente all'immersione nella dispersione di lattice. La soluzione coagulante è stata preparata mediante dissoluzione di nitrato di calcio tetraidrato ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) in alcool denaturato, in quantità controllate, ottenendo concentrazioni pari al 10% e al 5%. Sono state eseguite prove al variare sia della concentrazione del coagulante sia del valore di TSC del lattice.

Le procedure che hanno consentito di ottenere vasi con uno spessore qualitativamente adeguato sono le seguenti:

- A) immersione diretta nel lattice puro, ovvero mantenuto con il TSC originale (60,5%);
- B) immersione in soluzione coagulante costituita da nitrato di calcio al 10% in alcool denaturato, seguita da fase di asciugatura e successiva immersione nel lattice puro.

Nonostante alcuni esiti validi, come quelli mostrati in *Figura 3.3.1.5*, nel caso B non è stato possibile ottenere risultati ripetibili. Pertanto, alla fine, si è optato per la procedura A, consistente in una singola immersione nel lattice puro, non diluito e senza pretrattamento in soluzione coagulante. Tale scelta è stata motivata sia dalla riduzione dei tempi di asciugatura sia dalla maggiore ripetibilità dei risultati ottenuti.

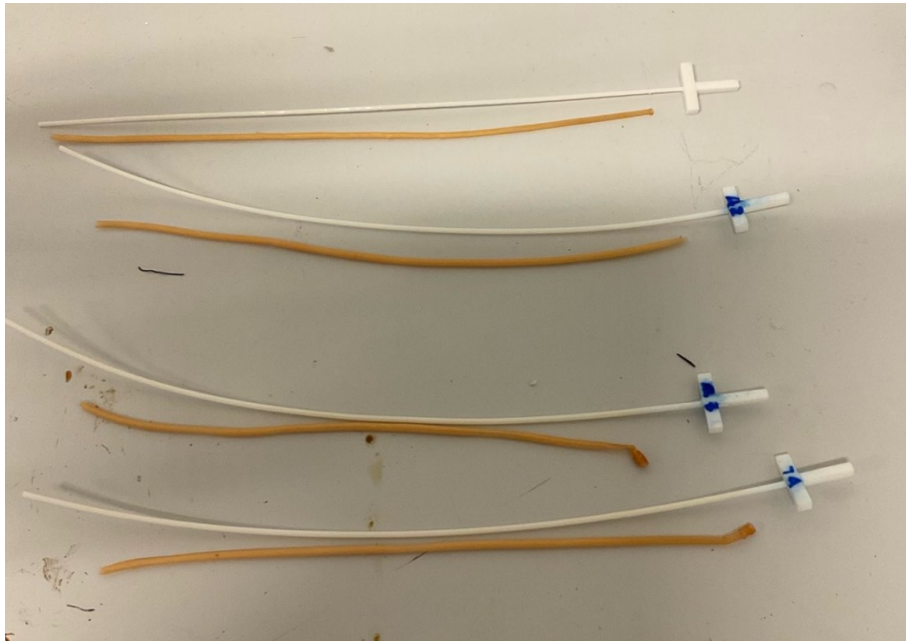


*Figura 3.3.1.5: Tubi in lattice ottenuti mediante procedura di dipping B (immersione in soluzione coagulante a base di nitrato di calcio, seguita da asciugatura e successiva immersione nel lattice puro)*

Per quanto riguarda la rimozione del tubo di lattice dallo stampo sono stati valutati diversi metodi di sfilamento. Un primo tentativo consisteva nell'inserire del liquido tra lo stampo e il film di lattice utilizzando un ago a farfalla collegato a una siringa riempita con acqua. Tale procedura si è rivelata complessa e poco efficace, in quanto nella maggior parte dei casi non è stato possibile ottenere lo sfilamento del tubo per intero. Un approccio alternativo ha invece

fornito risultati significativamente migliori: lo stampo, rivestito dal film di lattice formatosi, viene lasciato in immersione in una soluzione di acqua e detergente per piatti. In questo modo, dopo un opportuno tempo di ammollo, lo sfilamento del tubo dal mandrino risulta più agevole.

Tale protocollo di *dipping* ha permesso di ottenere tubi in lattice abbastanza regolari e sottili, come quelli mostrati nella *Figura 3.3.1.6*, tali da poter modellizzare le vene laterali caudali del simulatore.



*Figura 3.3.1.6: Tubi in lattice ottenuti mediante il protocollo di dipping A (singola immersione nel lattice puro); il campione in alto presenta un calibro di 1,5 mm, mentre gli altri sono caratterizzati da un calibro di 2 mm*

### **3.3.2 Studio dei materiali**

Per questa fase progettuale si è fatto riferimento ai risultati ottenuti da un lavoro di tesi precedente, in cui per simulare la stratificazione della pelle è stata scelta la seguente divisione in 3 *layer*: uno strato esterno di 0,7 mm in Agilus30Clear, uno strato intermedio di 1 mm realizzato con una mescola di GelMatrix al 60% e TissueMatrix al 40%, e uno strato interno in materiale giroide con sfondo TissueMatrix e cella giroide in Agilus30Clear con un rapporto 0:100. Tale configurazione è stata quella maggiormente apprezzata dagli esperti impegnati nella

stabulazione dei ratti presso il laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Pavia [16].

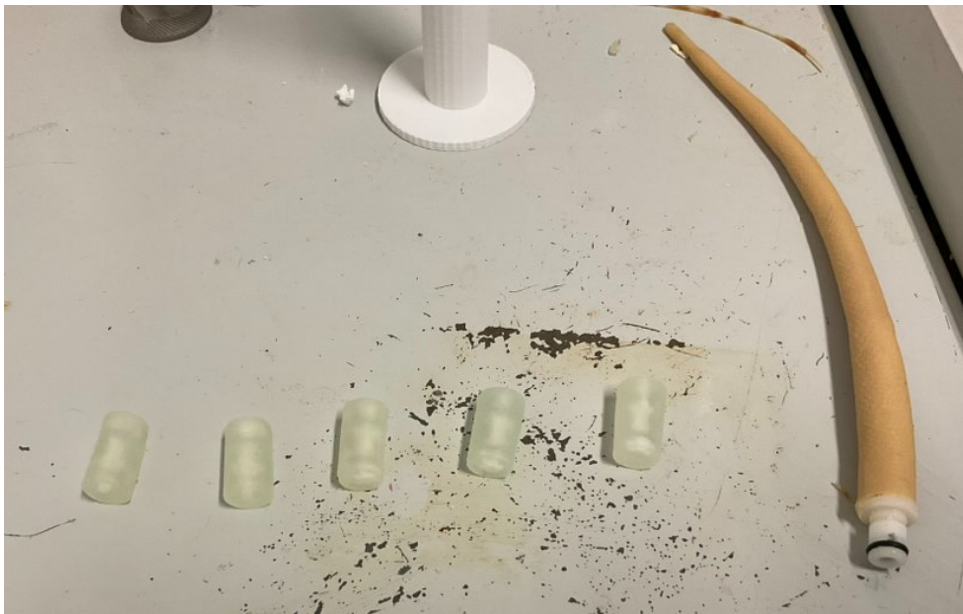
Sulla base dei *feedback* raccolti durante questa precedente sperimentazione, è stata mantenuta la scelta dei *preset* dei due strati di pelle più esterni in quanto valutati positivamente per la loro capacità di replicare l'effetto di distacco della cute. Tale caratteristica è importante per alcune procedure di laboratorio, come l'iniezione intramuscolare, poiché consente di simulare in modo realistico la mobilità relativa tra i tessuti e la percezione del passaggio dell'ago attraverso gli strati. Inoltre, la stratificazione dei materiali consente di riprodurre il comportamento meccanico dei tessuti a seguito della procedura, in particolare la deformazione locale e il successivo recupero della forma, simulando così in modo funzionale i processi di guarigione (*healing*).

Si è invece intervenuti sul materiale dello strato interno (*Background*) modificandone la composizione al fine di ottenere una miscela più compatta e meno permeabile, tale da evitare il rigonfiamento dovuto all'assorbimento di liquido durante la procedura di iniezione. Al fine di limitare tale problema sono stati definiti diversi *preset* .ADM nei quali è stata progressivamente aumentata la quantità di Agilus30Clear nello strato interno e, allo stesso tempo, ridotta quella di TissueMatrix, come schematizzato nella *Tabella 3*. Tale scelta è motivata dal fatto che Agilus30<sup>TM</sup> presenta una maggiore rigidità rispetto TissueMatrix<sup>TM</sup>, consentendo di incrementare la compattezza della miscela.

*Tabella 3: Schematizzazione della composizione del solo strato interno (BackGround) nei preset di prova (DM è un Digital Material personalizzato costituito da Agilus30Clear al 50% e TissueMatrix al 50%)*

<b>Prova</b>	<b>Funzione di distribuzione del BG</b>	<b>Composizione</b>
1	Giroide	Agilus30Clear e TissueMatrix (5:95)
2	Giroide	Agilus30Clear e TissueMatrix (10:90)
3	Giroide	Agilus30Clear e DM (0:100)
4	Giroide	Agilus30Clear e DM (20:80)
5	Giroide	Agilus30Clear e DM (50:50)
6	Digital Material	20% Agilus30Clear + 80% TissueMatrix
7	Digital Material	80% Agilus30Clear + 20% TissueMatrix

Tali *preset* sono stati valutati mediante la realizzazione di campioni di piccole dimensioni (*Figura 3.3.2.1*), rappresentativi di una sezione della coda. Tali campioni sono stati utilizzati per un'analisi tattile e meccanica preliminare, consentendo un confronto con un simulatore commerciale messo a disposizione dal laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Pavia. Questo approccio ha permesso di individuare la combinazione di materiali più idonea a riprodurre una consistenza il più simile possibile a quella del dispositivo di riferimento.



*Figura 3.3.2.1: Campioni di prova realizzati con diversi preset e simulatore commerciale utilizzato come riferimento per il confronto tattile*

Al termine della valutazione delle diverse composizioni di miscela, sono stati scelti due *preset* per realizzare due modelli finali con stessa divisione in tre *layer* ma diversa composizione dei materiali dello strato interno, come schematizzate nelle *Tabelle 4 e 5*. Nel modello A, lo strato interno è un *Digital Material* composto da Agilus30Clear al 80% e TissueMatrix al 20%. Nel modello B, invece, lo strato interno è caratterizzato da una funzione di distribuzione giroide con un rapporto 50:50 dove il materiale di sfondo è Agilus30Clear e la cella giroide è un *Digital Material* personalizzato costituito da Agilus30Clear al 50% e TissueMatrix al 50%.

Tabella 4: Schematizzazione del preset scelto per la stratificazione della pelle nel modello A

Pelle	Strato esterno (0,7 mm)	Agilus30Clear
	Strato intermedio (1 mm)	60% GelMatrix + 40% TissueMatrix
	Strato interno	80% Agilus30Clear + 20% TissueMatrix

Tabella 5: Schematizzazione del preset scelto per la stratificazione della pelle nel modello B (DM è un Digital Material personalizzato costituito da Agilus30Clear al 50% e TissueMatrix al 50%)

Pelle	Strato esterno (0,7 mm)	Agilus30Clear
	Strato intermedio (1 mm)	60% GelMatrix, 40% TissueMatrix
	Strato interno	Giroide con Agilus30Clear e DM (50:50)

### 3.4 Sviluppo dei questionari di valutazione

Nel processo di sviluppo di un modello sintetico è necessaria una fase di validazione, al fine di analizzarne le prestazioni nelle condizioni d'uso previste. A tal scopo è stato sviluppato un questionario destinato alla valutazione dell'efficacia e dell'efficienza dei modelli realizzati.

Come punto di riferimento iniziale sono stati considerati studi presenti in letteratura relativi a simulatori già esistenti. Nei lavori [28] [40] [41], descritti nel sottocapitolo 2.3, i simulatori disponibili in commercio vengono confrontati utilizzando dati statistici ottenuti dai questionari compilati dagli utenti. Tali questionari sono stati sviluppati rispettando le direttive implementate dalle Autorità Nazionali Competenti, quali la FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*), e la GV-SOLAS (*Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society of Laboratory Animal Science*), seguendo le linee guida pubblicate da GESIS (*Leibniz Institute for the Social Sciences*). Anche nel lavoro [36] vi è un esempio di questionario relativo al simulatore progettato dagli autori, i cui risultati sono riportati nell'articolo [38]. Questi questionari consentono di raccogliere informazioni sia sulle caratteristiche del simulatore, quali realismo e accuratezza anatomica, sia sull'esperienza dell'utilizzatore e sull'utilità nella formazione. Le risposte sono espresse prevalentemente mediante scale Likert a più livelli, che permettono di quantificare in modo standardizzato le percezioni degli utenti, affiancate, in alcuni casi, da domande aperte per raccogliere osservazioni qualitative. La scala Likert è uno strumento psicometrico utilizzato per misurare opinioni o percezioni. Essa prevede una serie di affermazioni o domande accompagnate da un insieme di risposte ordinate e simmetriche, che permettono al partecipante di esprimere il proprio grado di accordo o valutazione. Ogni livello della scala rappresenta un diverso grado di intensità della risposta, consentendo di trasformare percezioni soggettive in dati quantificabili e analizzabili statisticamente [65].

Sulla base di questi lavori, è stato progettato un questionario con l'obiettivo di valutare il realismo e la funzionalità del simulatore rispetto al modello *in vivo*. Tale questionario consiste in una serie di domande aperte volte a indagare l'aspetto del simulatore, tra cui caratteristiche tattili e parametri morfologici, e la sua efficacia nelle procedure di *training*. Questo approccio consente di raccogliere informazioni utili per individuare eventuali criticità riscontrate durante l'utilizzo e possibili miglioramenti.

Il questionario sottoposto in fase di validazione è il seguente:

**1) Quanto è realistico il simulatore rispetto al modello *in vivo*?**

Per ogni voce selezionare la risposta più appropriata. Se non è possibile esprimere una valutazione, selezionare “Non valutabile”.

	Molto	Abbastanza	Parzialmente	Poco	Per nulla	Non valutabile
Sensazione tattile						
Flessibilità della coda						
Passaggio da coda a parte finale del corpo						
Lunghezza e diametri della coda						
Diametro delle vene						
Posizione delle vene						
Visibilità delle vene						
Spessore delle vene						
Aspetto generale del modello						
Resistenza all'inserimento dell'ago						

**2) Quali procedure di *training* è stato possibile eseguire?**

**3) Vi sono procedure di *training* (applicate alla coda) che non è stato possibile eseguire?**

**4) Quale aspetto del simulatore è stato maggiormente apprezzato dal punto di vista anatomico e/o pratico?**

**5) Quali aspetti sono stati apprezzati meno?**

**6) Cosa potrebbe essere migliorato dal punto di vista anatomico e/o pratico?**

## 4. Risultati

### 4.1 Realizzazione del modello finale

Lo sviluppo del modello finale della coda è partito dalla modellazione CAD, fondamentale per l'avvio del successivo processo di stampaggio. La maggior parte delle componenti è stata progettata mediante il software Autodesk Inventor; fanno eccezione le parti caratterizzate da geometrie non uniformi, ovvero la colonna vertebrale e i suoi connettori, per le quali è stato utilizzato il software Autodesk Maya, frequentemente impegnato nell'ambito di *computer graphics*, ad esempio per film e videogiochi.

Per modellizzare la pelle è stata progettata una struttura conica lunga 190 mm con diametro prossimale pari a 12 mm e diametro distale di 6 mm. Tale struttura presenta dei canali cilindrici cavi di diametro pari a 2 mm, posizionati simmetricamente in modo da ospitare le due vene laterali della coda.



*Figura 4.1.1: Disegno CAD della pelle della coda*

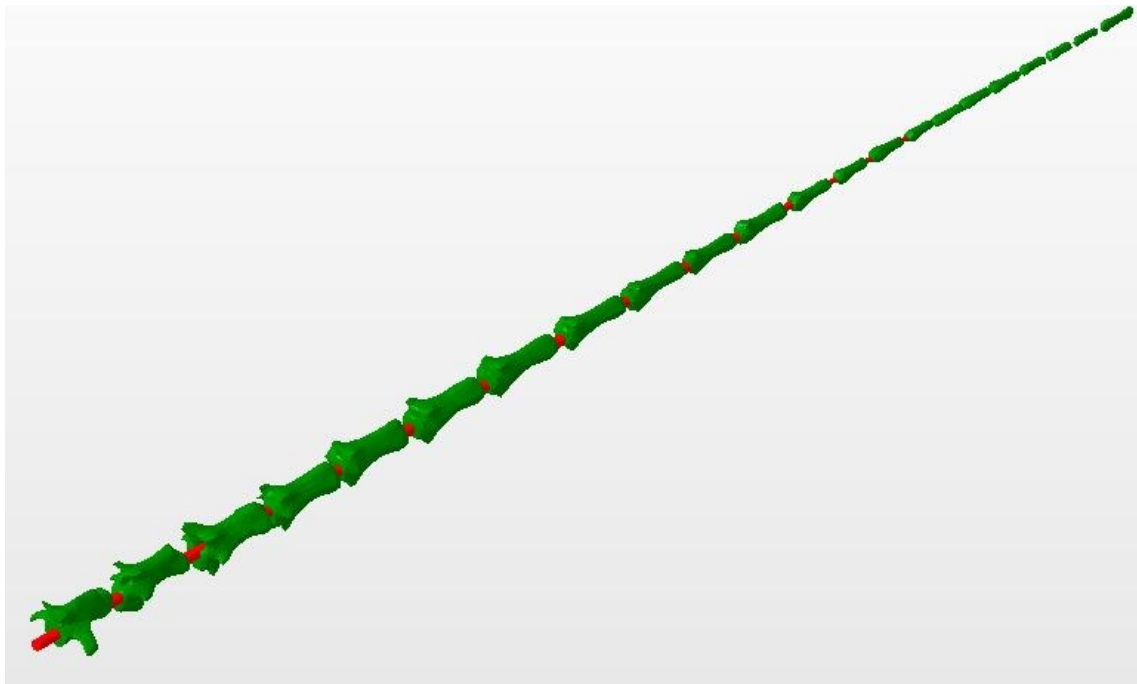
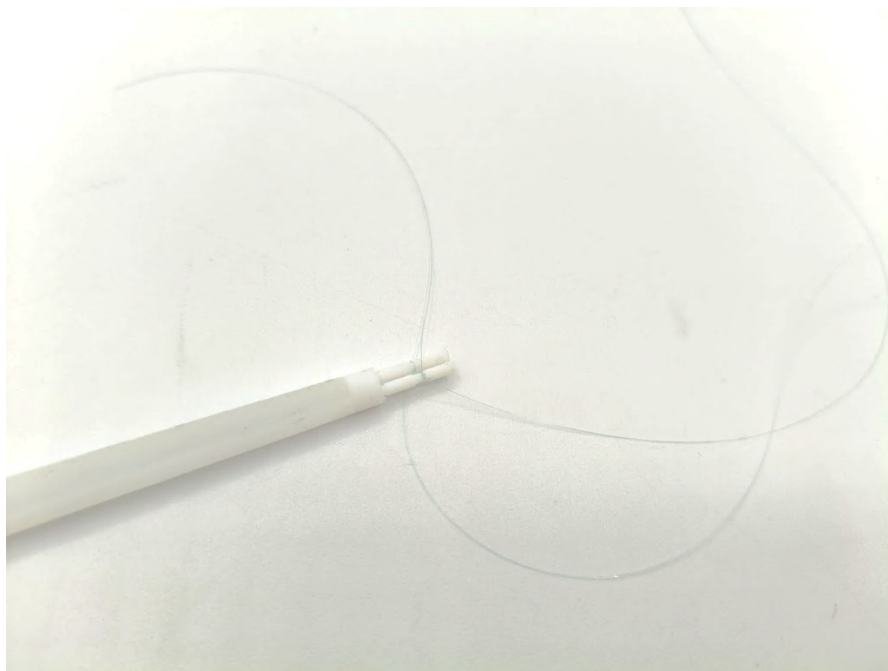


Figura 4.1.2: Disegno CAD dell'assembly delle vertebre e dei connettori

Per facilitare l'inserimento delle vene realizzate in lattice all'interno dei canali della coda è stato sviluppato un metodo che prevede l'uso di guide, che vengono stampate contestualmente al modello all'interno dei canali stessi. Le guide, realizzate in materiale rigido (VeroWhite™), sono dotate di una piccola scanalatura in cui può essere legato un filo (Figura 4.1.3). Rimuovendo la guida, il filo rimane all'interno del canale e funge a sua volta da elemento di guida e traino, in quanto il filo viene legato alla vena in modo che sfilandolo rimanga la vena inserita all'interno del canale della coda. Affinché il metodo risulti efficace, è necessario utilizzare un filo sufficientemente resistente e garantire una corretta realizzazione del nodo, al fine di evitare il rischio di un inserimento incompleto della vena. In fase sperimentale è stato impiegato un filo da pesca, risultato idoneo per tale applicazione.

Per consentire l'estrazione delle guide dai canali, queste sono state progettate con un diametro pari a 1,5 mm, inferiore rispetto a quello dei canali (2 mm). Il volume anulare risultante dalla differenza tra i due diametri è stato riempito, in fase di stampa, con un materiale di supporto (Figura 4.1.4) di consistenza gelatinosa, utilizzando il *preset* Pure Gel Support. Poiché l'estremità distale della guida presenta una dimensione pari a quello della cavità, durante l'estrazione della guida viene rimossa facilmente anche la struttura di supporto.

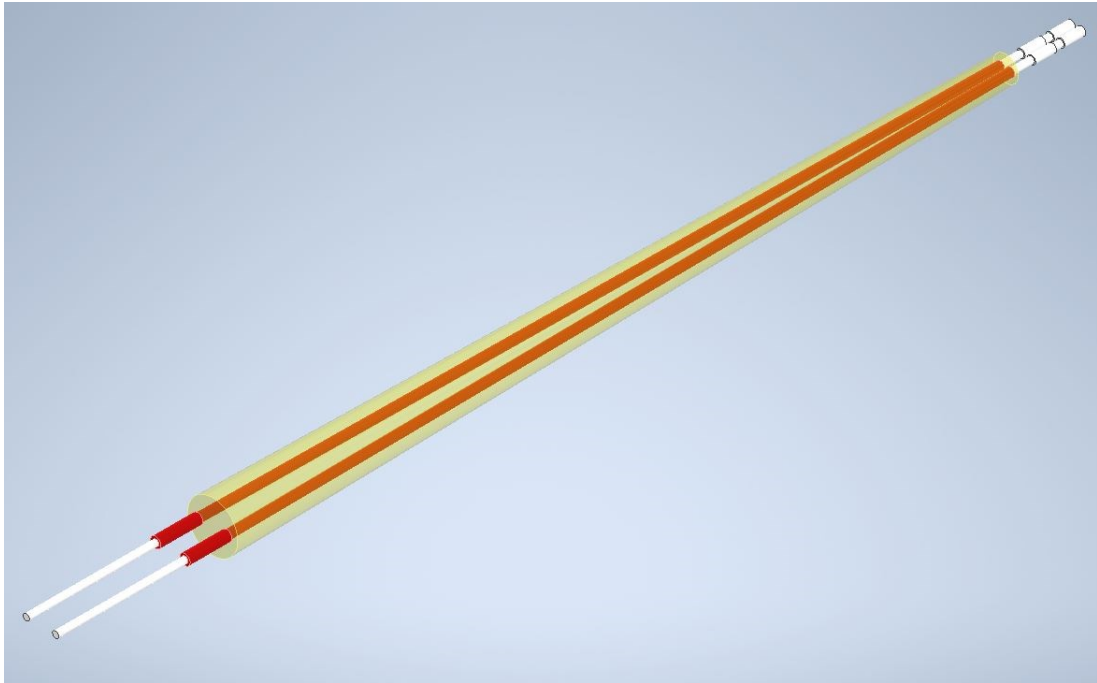
Nella *Figura 4.1.5* è mostrato il CAD dell'*assembly* di tutte e tre le parti per una maggiore chiarezza visiva dell'insieme. Nella *Figura 4.1.6* è mostrata la parte distale dello stesso *assembly* dove è stato messo in risalto il dettaglio del punto in cui viene legato il filo.



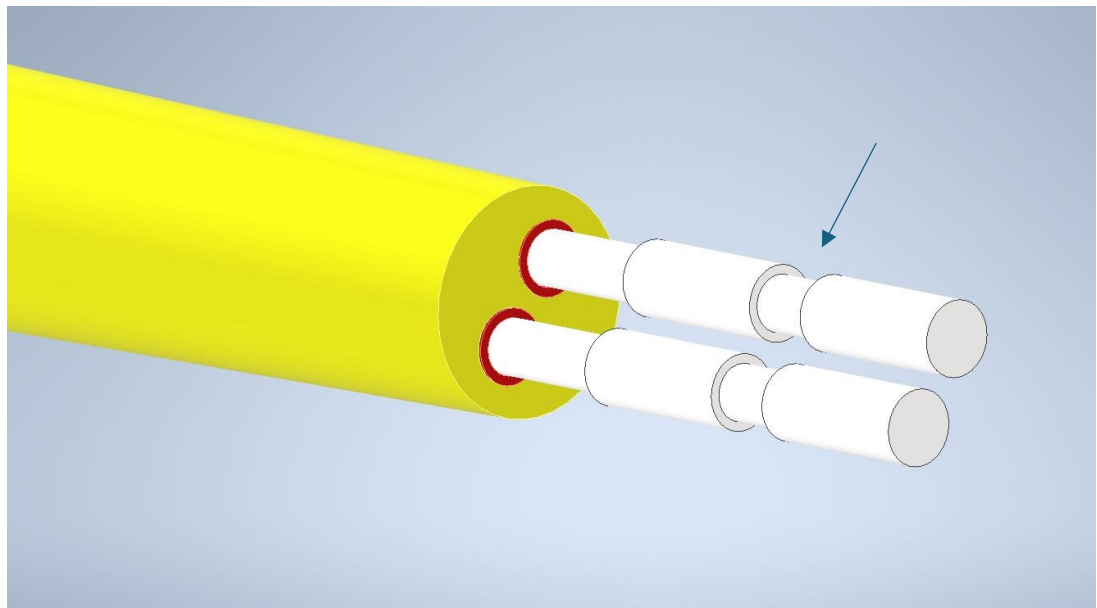
*Figura 4.1.3: Filo legato alla guida*



*Figura 4.1.4: Disegno CAD del supporto interno*



*Figura 4.1.5: Disegno CAD dell'assembly composto dalla parte della pelle (gialla), supporto interno (rosso) e guide (bianche)*

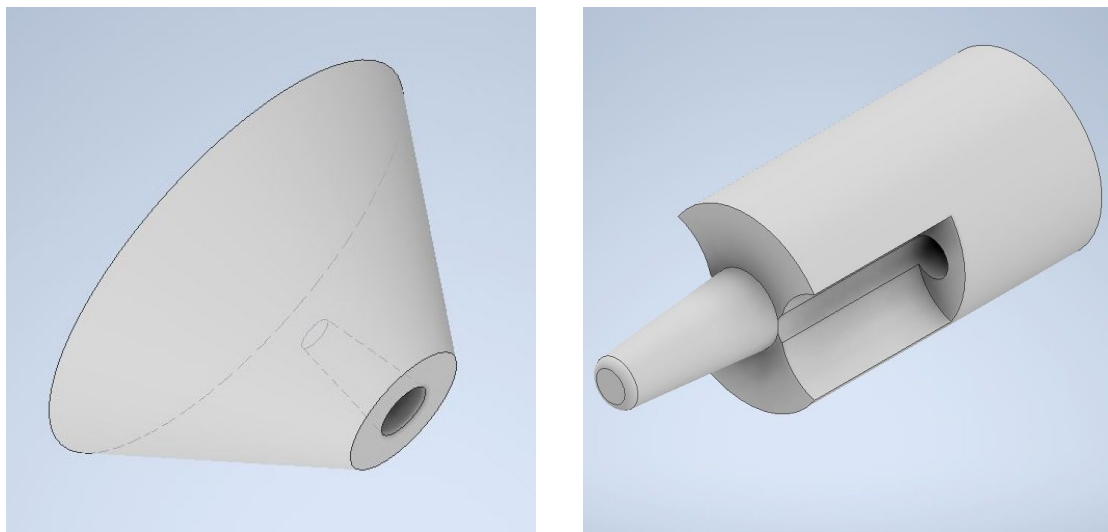


*Figura 4.1.6: Disegno CAD dell'assembly composto dalla parte della pelle (gialla), supporto interno (rosso) e guide (bianche) dove si mette in risalto il dettaglio della scanalatura*

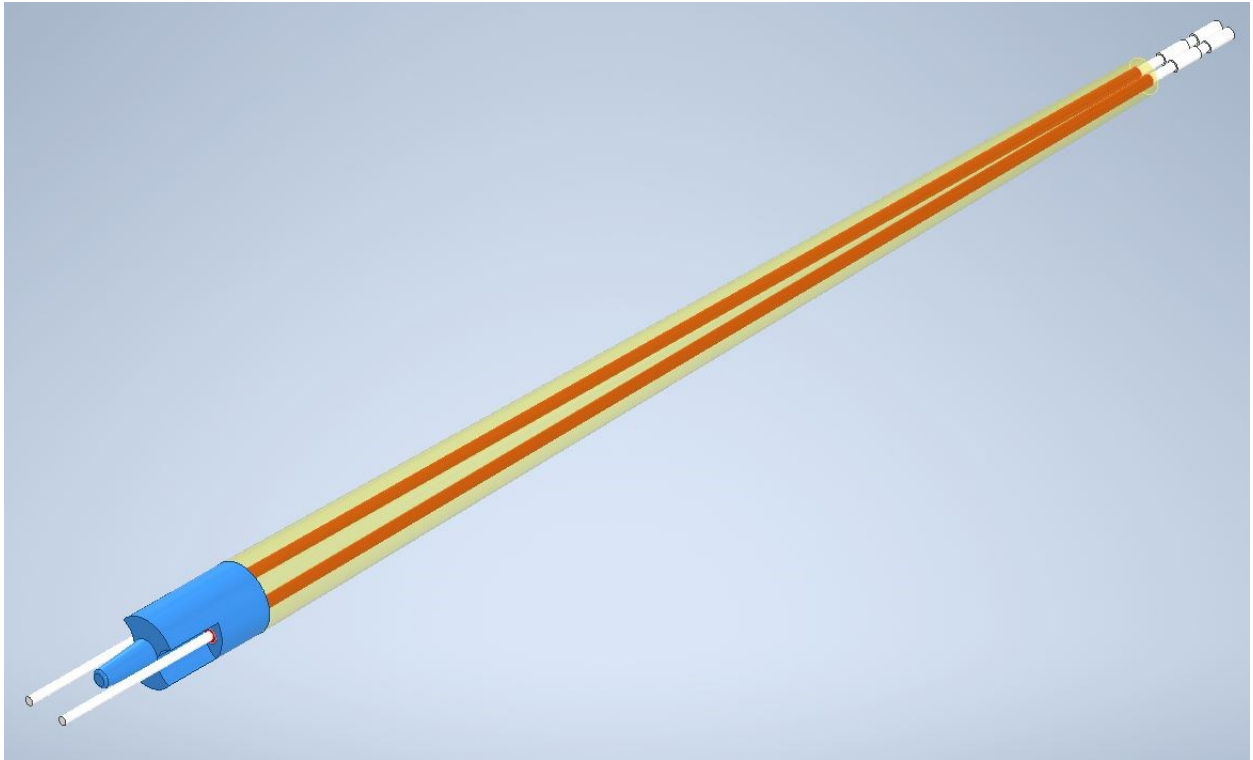


*Figura 4.1.7: Coda con i due vasi inseriti al suo interno tramite il metodo descritto*

È stata inoltre sviluppata la porzione di collegamento tra la coda e il corpo del ratto, mediante la progettazione di un sistema di incastro di tipo maschio-femmina, che consente un accoppiamento tra le due parti (*Figura 4.1.8*). I componenti di collegamento sono stati stampati in materiale rigido (VeroWhite™). In questa fase è stato necessario calibrare accuratamente le tolleranze dimensionali, al fine di ottenere il corretto funzionamento dell'incastro. Tolleranze troppo ridotte avrebbero infatti impedito l'assemblaggio, mentre tolleranze eccessive avrebbero compromesso la tenuta meccanica del collegamento.

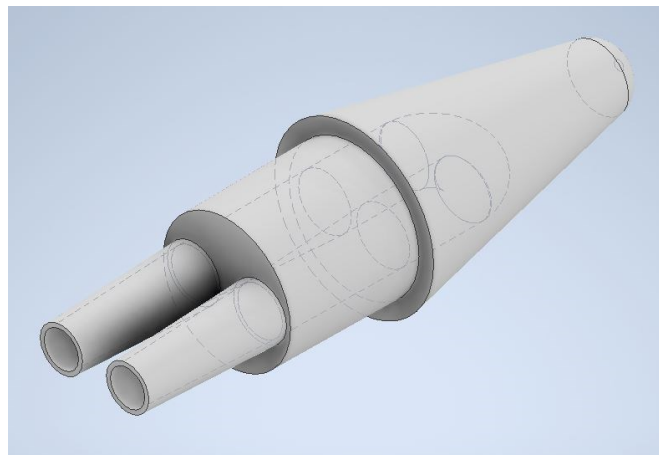


*Figura 4.1.8: Componenti del sistema di connessione tra coda e corpo del ratto: elemento femmina a sinistra; elemento maschio a destra*



*Figura 4.1.9: Disegno CAD dell'assembly finale con tutte le parti costituenti il modello: pelle (gialla), supporto interno (rosso), guide (bianche) e elemento dell'incastro (blu)*

Durante la fase progettuale si è iniziato a sviluppare anche un sistema per chiudere il circuito in modo da ottenere una circolazione unidirezionale del liquido. A questo scopo è stato progettato un connettore da incastrare nella parte distale della coda (*Figura 4.1.10*). Tuttavia, non è stato possibile raggiungere il risultato atteso e, di conseguenza, il sistema non è giunto alla fase di validazione.



*Figura 4.1.10: Disegno CAD del connettore distale provvisorio*

Come anticipato nel paragrafo 3.3.2, sono state realizzate due code che differiscono tra di loro per la composizione dei materiali dello strato interno. Entrambi i modelli presentano uno strato esterno di 0,7 mm in Agilus30Clear e uno strato intermedio di 1 mm realizzato con una miscela di GelMatrix al 60% e TissueMatrix al 40%. Per lo strato interno nel modello A è stato scelto un materiale digitale composto da Agilus30Clear al 80% e TissueMatrix al 20%, mentre nel modello B è stata scelta una distribuzione a giroide con rapporto 50:50 dove il materiale di sfondo è Agilus30Clear e la cella giroide è un *Digital Material* personalizzato costituito da Agilus30Clear al 50% e TissueMatrix al 50%.

Per quanto riguarda la componente vertebrale è stato selezionato un *preset* già esistente progettato dalla *community* di Stratasys, denominato *Dense Vertebra*, appartenente alla famiglia *Musculoskeletal*, all'elemento *Vertebra* e al modificatore *Dense*. I connettori della colonna sono stati realizzati in Agilus30Clear (Shore 30), con l'obiettivo di impedire lo spostamento delle vertebre rispetto alla loro posizione originaria e simulare i dischi intervertebrali della coda nativa del ratto.

Tabella 6: Schematizzazione dei preset scelti nei modelli finali (nel modello B: DM è un Digital Material personalizzato costituito da Agilus30Clear al 50% e TissueMatrix al 50%)

<b>Pelle</b>	<b>Strato esterno</b> (0,7 mm)	Agilus30Clear	
	<b>Strato intermedio</b> (1 mm)	60% GelMatrix + 40% TissueMatrix	
	<b>Strato interno</b>	<b>Modello A:</b> 80% Agilus30Clear + 20% TissueMatrix	<b>Modello B:</b> Giroide con Agilus30Clear e DM (50:50)
<b>Vertebre</b>		<i>Musculoskeletal – Vertebra – Dense</i>	
<b>Connettori della colonna</b>		Agilus30Clear	
<b>Supporto</b>		<i>Blood Vessel – Pure Gel Support</i>	
<b>Guide</b>		VeroWhite™	
<b>Parte dell'incastro</b>		VeroWhite™	

Ulteriore differenza tra il modello A e il modello B è il calibro delle vene inserite al loro interno. Nel modello A si è scelto di inserire le vene con diametro pari a 2 mm (*Figura 4.1.11*). Nel modello B invece sono state inserite le vene con calibro minore, pari a 1,5 mm (*Figura 4.1.12*).



*Figura 4.1.11: Modello A*



*Figura 4.1.12: Modello B compreso anche della parte di collegamento con la parte finale del corpo e del connettore distale provvisorio*

## 4.2 Validazione

I modelli finali realizzati sono stati valutati da utenti esperti nella manipolazione di animali da laboratorio presso il laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Pavia.

A livello anatomico, le dimensioni della coda in termini di lunghezza e diametri e la curvatura della parte finale del corpo sono state considerate abbastanza fedeli alla realtà. Anche la flessibilità e la sensazione al tatto sono state valutate positivamente. Tra i due modelli, a livello di consistenza, è stata preferita la versione con lo strato interno realizzato con la miscela 80% Agilus30Clear + 20% TissueMatrix, ovvero il modello A. Dunque, è stato scelto questo modello per simulare le procedure di laboratorio che tipicamente vengono eseguite sulla coda, quali il prelievo di sangue e l'iniezione endovenosa. La prima procedura è stata eseguita con un ago con calibro da 30G, mentre per la seconda è stato impiegato un ago da 25G.



*Figura 4.2.1: Simulazione della procedura di prelievo di sangue nella coda A*



*Figura 4.2.2: Simulazione della procedura di somministrazione endovenosa nella coda A*

In entrambe le procedure testate, sono state apprezzate in modo particolare la resistenza della pelle alla penetrazione dell'ago e la percezione della corretta posizione dell'ago all'interno del vaso. È stato riportato che la forza necessaria per perforare la pelle mediante l'ago nel simulatore risulta comparabile a quella richiesta nel ratto vivo.

Per quanto riguarda il sistema venoso, è stata apprezzata la realizzazione del sistema che non permette la fuoriuscita del liquido dai compartimenti vascolari. Infatti, durante tali procedure si ha avuto la conferma del fatto che è possibile inserire il liquido all'interno delle vene senza che questo fuoriesca e vada a gonfiare il materiale circostante ai vasi. Tale caratteristica è importante perché permette la riusabilità del modello, dimostrando il raggiungimento dell'obiettivo del progetto. In questo modo, tramite il metodo di inserimento ideato, basato sulle guide a cui si può legare un filo, è possibile sostituire i vasi con dei nuovi, mantenendo la struttura restante invariata.

Gli esperti hanno ritenuto che i modelli dotati di vene con calibro pari a 2 mm siano più idonei per la fase iniziale di formazione, in quanto facilitano l'identificazione del vaso e l'esecuzione della procedura. L'impiego di vene di calibro inferiore consente invece di aumentare progressivamente il livello di difficoltà per affinare la precisione dell'operatore. Per migliorare la visibilità dei vasi, si consiglia di riempirli con un liquido colorato. Inoltre, gli esperti hanno

indicato come utile conoscere il volume interno delle vene per definire i volumi di iniezione e valutare la corretta esecuzione della procedura. Tale misura può essere facilmente determinata.

La difficoltà di accesso alla vena non è adeguatamente riproducibile con questo simulatore, poiché il calibro dei vasi risulta troppo elevato rispetto alle vene reali. Per tale ragione gli esperti hanno suggerito di diminuire ulteriormente il calibro delle vene. Poiché con la tecnica di *dipping* questo non si è rivelato possibile, in quanto il diametro di lume minimo ottenibile è stato 1.5 mm, tale miglioramento potrebbe essere ottenuto tramite altre tecnologie monomateriale che permettono di ottenere cavità con calibro inferiore.

Nel modello *in vivo*, in caso di posizionamento non corretto dell'ago e conseguente iniezione fuori vena, il liquido viene immesso nei tessuti circostanti, determinando la comparsa di un'area biancastra, associata a un lieve rigonfiamento locale. Tale condizione di errato posizionamento è stata riprodotta utilizzando il simulatore, osservando la comparsa di un effetto analogo e una maggiore resistenza all'avanzamento dell'ago rispetto al caso reale. Questa differenza può risultare utile in ambito didattico, in quanto fornisce una percezione dell'errore di posizionamento più evidente da parte dell'operatore. Tuttavia, in questa situazione, la consistenza del simulatore diventa eccessivamente morbida, compromettendone la riutilizzabilità. Tale criticità potrebbe essere migliorata sviluppando un metodo che consenta la rimozione del liquido accumulato.

Tale modello è stato inoltre confrontato con un simulatore commerciale acquistato dal laboratorio, in particolare il simulatore CurveVet<sup>TM</sup>, descritto nel capitolo 2.3. Tra i due è stato preferito il modello sviluppato in questo progetto per la sua consistenza più vicina a quella reale rispetto al simulatore commerciale, ritenuto troppo poco rigido in quanto manca la componente vertebrale. In generale, un ulteriore vantaggio del modello sviluppato è il costo notevolmente inferiore rispetto ai modelli in commercio, grazie anche al fatto del sistema di vasi intercambiabili realizzati in lattice, il quale è un materiale a basso costo.

Un aspetto da migliorare riguarda il sistema di connessione finale, al fine di realizzare un circuito chiuso che consenta al liquido di scorrere in un'unica direzione e di riempire entrambe le vene mediante l'immissione del liquido da un unico punto.



*Figura 4.2.3: Simulatore inserito all'interno di un restrainer per roditori*

*Tabella 7: Considerazioni ottenute dalla validazione del modello A*

<b>Caratteristica</b>	<b>Valutazione</b>
Dimensioni	Realistiche
Flessibilità	Realistica
Resistenza all'inserimento dell'ago	Realistica
Calibro delle vene	Sovradimensionato
Circolazione chiusa del liquido	Da implementare
Riutilizzabilità	Da ottimizzare

## Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un simulatore della coda di ratto destinato al *training* di procedure di laboratorio, in un'ottica coerente con i principi delle 3R e con la crescente esigenza di ridurre l'uso di animali nella formazione del personale impiegato nella ricerca preclinica.

L'impiego della tecnologia di manifattura additiva *Material Jetting* ha permesso di sviluppare un modello in grado di replicare al meglio le caratteristiche meccaniche dei diversi tessuti, mentre il processo di *dipping* è stato utilizzato per la realizzazione delle vene laterali caudali in lattice. Durante la fase di progetto sono stati realizzati due modelli, differenti per la composizione dello strato interno ma caratterizzati dalla stessa struttura esterna. A seguito delle valutazioni condotte da esperti presso il laboratorio di Chirurgia Sperimentale, il modello A è risultato preferibile, in quanto ha mostrato una consistenza più realistica. Tale modello presenta una stratificazione della pelle in 3 *layer*: uno strato esterno di 0.7 mm in Agilus30Clear, uno strato intermedio di 1 mm realizzato con un *digital material* composto da GelMatrix al 60% e TissueMatrix al 40% e uno strato interno realizzato con un *digital material* composto da Agilus30Clear al 80% e TissueMatrix al 20%.

I risultati ottenuti dimostrano che il simulatore ottenuto è in grado di riprodurre in maniera soddisfacente le principali caratteristiche anatomiche e biomeccaniche della coda, offrendo un'esperienza abbastanza realistica durante l'esecuzione di prelievi e iniezioni endovenose. In particolare, la resistenza alla penetrazione dell'ago, la percezione del corretto posizionamento intravascolare e la possibilità di inserire il liquido senza fuoriuscite contribuiscono all'efficacia didattica del simulatore. Un elemento distintivo del modello sviluppato è rappresentato dalla presenza di vene intercambiabili, che consente di prolungare la vita utile del dispositivo e di ridurre i costi complessivi, rendendolo competitivo rispetto ai simulatori commerciali attualmente disponibili.

Tuttavia, sono emerse alcune criticità, tra cui la difficoltà nel riprodurre fedelmente il calibro reale delle vene, la limitata riutilizzabilità in caso di iniezione extra vascolare e l'assenza di un circuito chiuso per la circolazione del liquido.

Ulteriori sviluppi riguardano la realizzazione di un modello completo dell'animale, che consenta di simulare anche altre procedure, come il *gavage*. In questo caso, risulterebbe utile integrare due accessi distinti, trachea ed esofago, al fine di permettere all'operatore di

distinguere correttamente il posizionamento della sonda e di esercitarsi nel riconoscimento di eventuali errori.

Pur presentando ancora margini di miglioramento, il simulatore sviluppato si configura come uno strumento promettente per la formazione del personale di stabulario, permettendo di acquisire competenze pratiche senza l'impiego di animali vivi e contribuendo così a una ricerca scientifica più etica.

## Bibliografia

- [1] Pavlović et al., «Beyond the cage: The rise and promise of non-animal models in biomedical research,» *European Journal of Pharmacology*, vol. 1019, 2026.
- [2] Domínguez-Oliva et al., «The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications,» *Animals*, vol. 13, n. 1223, 2023.
- [5] Kaplan et al., «Protecting Human and Animal Health: The Road from Animal Models to New Approach Methods,» *Pharmacological reviews*, vol. 76, n. 2, pp. 251-266, 2024.
- [6] Vitale, «Replacement in the spirit of the 3Rs principle,» *Rapporti ISTISAN 22/18*, 2022.
- [7] Lauwereyns et al., «Toward a common interpretation of the 3Rs principles in animal research,» *Lab animal*, vol. 52, n. 12, pp. 347-350, 2024.
- [9] Bryda, «The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research,» *Missouri Medicine*, vol. 110, n. 3, pp. 207-11, 2013.
- [10] Hashway e Wilding, «Chapter 3 - Translational Potential of Rats in Research,» in *The Laboratory Rat (Third Edition)*, Suckow et al., 2020, pp. 77-88.
- [12] «Small mammals - Rats,» in *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species*, 2005, pp. 210-225.
- [13] Kudelkina et al., «Comparative Characterization of High-Grade Glioma Models in Rats: Its Importance for Neurobiology,» *Clinical and Translation Neuroscience*, vol. 9, n. 58, 2025.
- [14] Crisler et al., «Chapter 4 - Functional Anatomy and Physiology,» in *The Laboratory Rat (Third Edition)*, Suckow et al., 2020, pp. 91-132.
- [15] Tsukamoto, «Educational efficacy of training videos and simulators for teaching basic mouse experimental skills to novice veterinary students,» *Experimental animals*, vol. 75, n. 1, pp. 90-98, 2026.

- [16] V. Fabris, «Modelli sintetici di training realizzati con tecniche additive nel campo della ricerca sperimentale su animale,» 2023/2024.
- [17] Hidayat, «Anatomy and Physiology of Animal Model Rats in Biomedical Research,» *Biomedical Journal of Indonesia*, vol. 7, n. 2, 2021.
- [18] Kohn e Clifford, «Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats,» in *Laboratory Animal Medicine (2nd edition)*, 2002.
- [19] Mohd-Qawiem et al., «Detection of zoonotic-borne parasites in Rattus spp. in Klang Valley, Malaysia,» *Veterinary World*, vol. 15, n. 4, pp. 1006-1014, 2022.
- [20] Medina, «Rat Dissection Guide».
- [21] Löw et al., «12 - Dissection of the Rat (Rattus norvegicus),» in *Atlas of Animal Anatomy and Histology*, 2016, pp. 325-399.
- [22] Taylor e Bordoni, *Histology, Blood Vascular System*, StatPearls Publishing, 2023.
- [23] Hori et al., «Participation of ventral and dorsal tail muscles in bending movements of rat tail,» *Anatomical Science International*, vol. 86, pp. 194-203, 2011.
- [24] Wagner et al., «Generation of High-Quality Pharmacokinetic Data From Parallel Tail Vein Dosing And Bleeding in Non-cannulated Rats,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 110, n. 10, pp. 3491-3499, 2021.
- [25] Tsuchiya, «The Rat Tail as a Model Organ for Peripheral Vasodilation,» *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain*, 2001.
- [26] Brown, «Blood collection from the tail of a rat,» *Lab Animal*, vol. 35, pp. 24-25, 2006.
- [28] Corte et al., «Anatomical Evaluation of Rat and Mouse Simulators for Laboratory Animal Science Courses,» *Animals*, vol. 11, n. 12: 3432, 2021.
- [36] Gantenbein et al., «3D-printed Mouse Tail Models to promote the 3Rs in i.v. injection training,» *Zurich Integrative Rodent Physiology*, 2022.

- [38] Gantenbein et al., «Preliminary feedback data on the use of 3D-printed mouse tail models for i.v. injection training and future developments,» *Zurich Integrative Rodent Physiology*, 2024.
- [39] Corte et al., «Developing a new simulator of the rat for laboratory animal training courses using 3D printing,» 2019.
- [40] Humpenöder et al., «Alternatives in Education—Evaluation of Rat Simulators in Laboratory Animal Training Courses from Participants' Perspective,» *Animals*, vol. 11, n. 12, 2021.
- [41] Humpenöder et al., «Alternatives in Education—Rat and Mouse Simulators Evaluated from Course Trainers' and Supervisors' Perspective,» *Animals*, vol. 11, n. 1848, 2021.
- [42] Andrade et al., «Latex and natural rubber: processing techniques for biomedical applications,» *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 40, p. 913–927, 2023.
- [43] Kantasa et al., «Multifunctional role of calcium chloride in improving the chemical, mechanical, and physical properties of natural and synthetic rubber latex for gloves and transdermal patch films,» *Industrial Crops & Products*, vol. 223, 2025.
- [44] Andrade et al., «Latex and natural rubber: recent advances for biomedical applications,» *Polímeros*, vol. 32, n. 2, 2022.
- [45] Zhao et al., «Optimization Study of a High-Efficiency Preservative for Ammonia-Free Concentrated Natural Rubber Latex,» *Polymers*, vol. 17, n. 188, 2025.
- [46] Payungwong et al., «The Interplay of Protein Hydrolysis and Ammonia in the Stability of Hevea Rubber Latex during Storage,» *Polymers*, vol. 15, n. 24, p. 4636, 2023.
- [47] International Organization for Standardization, «ISO 124:2014 Natural rubber latex concentrate - Determination of total solids content,» 2014.
- [48] Maraphum et al., «Fast determination of total solids content (TSC) and dry rubber content (DRC) of para rubber latex using near-infrared spectroscopy,» *Industrial Crops and Products*, vol. 187(B), 2022.

- [49] Groves et al., «The coagulant dipping process of nitrile latex: investigations of former motion effects and coagulant loss into the dipping compound,» *Royal Society of Chemistry*, 2022.
- [50] Lovato et al., «Performance-Enhancing Materials in Medical Gloves,» *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 14(7), n. 349, 2023.
- [51] Elkaseer et al., «Material jetting for advanced applications: A state-of-the-art review, gaps and future directions,» *Additive Manufacturing*, vol. 60 (A), 2022.
- [52] Daneshdoost et al., «Structure-performance relationships of multi-material jetting polymeric composites designed at the voxel scale: Distribution and composition effects,» *Journal of Manufacturing Processes*, vol. 131, pp. 2118-2132, 2024.
- [53] Gülcan et al., «The State of the Art of Material Jetting—A Critical Review,» *Polymers*, vol. 13(16), n. 2829, 2021.
- [54] Waheed et al., «3D printed microfluidic devices: enablers and barriers,» *Lab on a Chip*, vol. 16, pp. 1993-2013, 2016.
- [55] Maleki e Bertola, «Recent advances and prospects of inkjet printing in heterogeneous catalysis,» *Catalysis Science & Technology*, vol. 10(10), 2020.
- [63] Abdullah at al., «Parameter manipulation study in producing thinner natural rubber films via response surface methodology,» *Journal of Rubber Research*, vol. 2, p. 239–253, 2025.
- [65] Koo e Yang, «Likert-Type Scale,» *Encyclopedia*, vol. 5(1), n. 18, 2025.

## Sitografia

- [3] AIRC, [Online]. Available: <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/ricerca-sul-cancro/sperimentazione-animale>.
- [4] Fondazione Veronesi, 2025. [Online]. Available: <https://www.fondazioneveronesi.it/ricerca-sui-tumori/sperimentazione-animale#block-il-principio-delle-3r-rimpiazzo-riduzione-e-raffinamento-6>.
- [8] NC3R, [Online]. Available: <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>.
- [11] RESEARCH4life, «Sperimentazione animale: i dati per il 2021 e il 2022. Numeri, specie e provenienza,» 2024. [Online]. Available: <https://www.research4life.it/sperimentazione-animale-i-dati-per-il-2021-e-il-2022-numeri-specie-e-provenienza/>.
- [27] Natsume Seisakusho Co, «Natsume Rat,» [Online]. Available: <https://www.nazme.co.jp/product/english/kn-590-e/>.
- [29] RescueCrittters, «Mimolette (mee-moh-let) Lab Rat,» [Online]. Available: <https://rescuecritters.com/product/mimolette-mee-moh-let-lab-rat/>.
- [30] Norepeca, «Squeekums Rat Mannikin,» [Online]. Available: <https://norecopa.no/norina/squeekums-rat-mannikin/>.
- [31] Braintree Scientific, Inc., «CurVet Rat Training Simulator,» [Online]. Available: <https://www.braintreesci.com/teaching-reference-products/training-models/curvet-rat-training-simulator/>.
- [32] AnthroTek, «AnthroRat,» [Online]. Available: <https://anthrotek.com/laboratory-animal-training.html>.
- [33] CLEA, «New "Rat Simulated Tail Vein",» [Online]. Available: [https://www.clea-japan.com/promotion/english/simulator\\_for\\_rat\\_ENG](https://www.clea-japan.com/promotion/english/simulator_for_rat_ENG).
- [34] H. Inc., «Humaneway Rat Tail Vein Simulator,» [Online]. Available: <https://hundred-inc.com/products/humaneway-rat-tail-vein-simulator>.

- [35] Erler-Zimmer Medical GmbH, «Rat Tail Vein Training Simulator,» [Online]. Available: <https://erler-zimmer.de/en/Rat-Tail-Vein-Training-Simulator/VET4250>.
- [37] Norecopa, «3D printed mouse tails for i.v. injection (Gantenbein),» [Online]. Available: <https://norecopa.no/norina/3d-printed-mouse-tails-for-iv-injection-gantenbein/>.
- [56] Stratasys, «J750 Digital Anatomy,» [Online]. Available: <https://support.stratasys.com/it/printers/polyjet-legacy/j750-digital-anatomy>.
- [57] Stratasys. [Online]. Available: [https://www.stratasys.com/contentassets/ab69196d173842cca634d07febba0f10/mds\\_pj\\_vero\\_0221a-2.pdf?v=4a1902](https://www.stratasys.com/contentassets/ab69196d173842cca634d07febba0f10/mds_pj_vero_0221a-2.pdf?v=4a1902).
- [58] Stratasys. [Online]. Available: <https://www.stratasys.com/en/materials/materials-catalog/polyjet-materials/agilus30/>.
- [59] Stratasys. [Online]. Available: [https://www.stratasys.com/siteassets/materials/materials-catalog/polyjet-materials/tissue-matrix/op\\_pj\\_tissuematrix\\_a4\\_0222a.pdf?v=4ae95a](https://www.stratasys.com/siteassets/materials/materials-catalog/polyjet-materials/tissue-matrix/op_pj_tissuematrix_a4_0222a.pdf?v=4ae95a).
- [60] Stratasys. [Online]. Available: [https://www.stratasys.com/siteassets/materials/materials-catalog/polyjet-materials/gel-matrix/op\\_pj\\_dap\\_gelmatrix-material\\_a4\\_0524a.pdf?v=4ad3b1](https://www.stratasys.com/siteassets/materials/materials-catalog/polyjet-materials/gel-matrix/op_pj_dap_gelmatrix-material_a4_0524a.pdf?v=4ad3b1).
- [61] Stratasys. [Online]. Available: <https://www.stratasys.com/it/materials/materials-catalog/polyjet-materials/bonematrix/>.
- [62] Stratasys, «GrabCAD Help Center,» [Online]. Available: <https://support.stratasys.com/en/Software/GrabCAD-Print/Getting-Started>.
- [64] Prochima. [Online]. Available: <https://www.prochima.it/latex-lattice-naturale-prevulcanizzato/#latex/1/>.

## **Ringraziamenti**

Desidero ringraziare la Professoressa Stefania Marconi per la sua disponibilità e per avermi dato l'opportunità di svolgere questo progetto di tesi presso il laboratorio ProtoLab. Rivolgo un particolare ringraziamento a Leonardo Montaldo per il suo contributo e per il costante aiuto durante le varie fasi del lavoro. Ringrazio anche il laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Pavia per i riscontri forniti nella fase di valutazione dei modelli, fondamentali per la conclusione del progetto.