

Diseño de andamios paramétricos con porosidad variable e interconectada para ingeniería de tejidos óseos

Sergio Gómez González¹,

EEBE. Enginyeria Gràfica i de Disseny

Daniela Vlad

Faculty of Medical Bioengineering, “Gr. T. Popa” University of Medicine and Pharmacy

José López López

EEBE. Física

Enrique Fernández Aguado⁴

ETSEIB. Ciència i Enginyeria dels Materials

Resumen

Se proponen nuevos métodos de diseño de andamios porosos a partir de la aplicación de software de libre uso Grasshopper© de Rhinoceros 3D con el objetivo de diseñar modelos con porosidad variable e interconectada semejante al tejido trabecular óseo. El presente estudio describe los procesos de creación paramétrico tridimensional de modelos porosos y su aptitud para rellenar la forma interna del macro defecto óseo adaptado a las necesidades específicas del paciente. El objetivo final perseguido es crear un modelo tridimensional (3D) mimético sustitutivo del tejido autólogo del paciente, que rellene la patología del macro defecto óseo y que pueda ser fabricado a partir de técnicas de Fabricación Aditiva con las propiedades mecánicas y fluidicas adecuadas para facilitar el soporte mecánico, la adhesión y el crecimiento celular. Para facilitar la adhesión celular se requiere maximizar la relación de superficie (BS) respecto del volumen total de tejido (BV) o volumen total (TV).

Abstract

The general objective of this project focuses on applying modularity to the hydrocarbon separators of the multinational ACO, specifically in its Spanish subsidiary. These warehouses have extraordinary dimensions and volumes that make them a logistical challenge. After suffering these inconveniences for years, the company requests an R&D project from the UPC that will allow the development of a viable solution for these products.

1. Introducción

El hueso es el segundo tejido más trasplantado en el mundo. En las últimas décadas los autoinjertos y los aloinjertos se han utilizado en la reparación ósea. Sin embargo, el dolor, la infección, el rechazo inmunológico y otras patologías asociadas provocan un interés cada vez mayor en el desarrollo de hueso artificial con microestructura mimética al hueso natural. El interés es notable como puede verse en el aumento exponencial del número de publicaciones dedicadas al diseño y fabricación de andamios óseos en Ingeniería de Tejidos en la última década (Bose et al., 2012).

Los recientes avances en el diseño y fabricación de andamios en Ingeniería de Tejidos óseos (BTE) han tratado de mejorar las propiedades mecánicas y las propiedades de flujo a su través. Alta resistencia específica, alta permeabilidad y una disposición porosa irregular con elevada relación BS/TV son las propiedades deseadas en el diseño de la próxima generación andamios en BTE (Hutmacher et al., 2007; Hollister, 2006). Las principales limitaciones en los diseños de los andamios actuales son la baja resistencia mecánica y la falta de suficiente vascularización. Por esta razón, los criterios generales para diseñar andamios deben incluir una geometría interna similar a la microestructura del hueso trabecular esponjoso, las propiedades del transporte de masa, las propiedades mecánicas y el propio biomaterial (Hutmacher et al., 2004). En el diseño tridimensional de la estructura se

debe tener en cuenta el tamaño y la forma de los poros, las interconexiones, la separación trabecular (Tb.Sp) y el grosor trabecular (Tb.Th), no sólo por las propiedades mecánicas, sino también para facilitar la penetración de las células en el andamio, su adhesión y la facilidad al flujo de nutrientes a su través (Tabla 1). Las propiedades descritas para los andamios se deben mantener durante el proceso de la degradación del mismo hasta su completa sustitución por la nueva formación del tejido.

Hoy en día se utiliza software de Diseño Asistido por Ordenador (CAD) como CATIA[®] (*Dassult Systèmes*), Rhinoceros 3D[®] (*McNeel, USA*) o SolidWorks[®] (*Dassult Systèmes*) en el modelado de geometrías simples de andamios 3D a partir de la combinación de sólidos o primitivas estándar (cilindros, esferas, cubos, etc.) con operaciones booleanas de unión, resta e intersección. El empleo de operaciones de copia múltiple como matrices en 3D permiten definir estructuras porosas de repetición periódica (Figura 1A). Varios autores han creado una biblioteca paramétrica de estructuras regulares de andamios, conocido con el nombre de CASTS (Diseño de Andamios para Ingeniería de Tejidos), y están a disposición de la comunidad científica con el objeto de reducir el tiempo de diseño (Cheah et al., 2003).

Implicit Surface Modeling (ISM) es un nuevo enfoque en el diseño de andamios para Ingeniería de Tejidos a partir de su descripción matemática (Kapfer et al., 2011; Yoo, 2011). *Schwar's Diamond*, *Schoen's Gyroid* y otros, son algunos de los modelos porosos más utilizados en la fabricación de andamios. Los modelos son definidos con ecuaciones triples periódicas a partir de funciones trigonométricas implícitas (Schoen, 1970). Se caracterizan por poseer superficie mínima y tener un efecto positivo en la migración celular y el crecimiento de tejido (Olivares et al., 2009). En la Figura 1B se muestran algunos de los modelos ISM creados a partir de la definición de sus ecuaciones con la aplicación de uso libre *3DKSurf*[®] (Taha).

Biocompatibilidad	Capacidad para realizar su función en el tejido del huésped sin provocar cualquier respuesta inmune.
Biodegradabilidad	La velocidad de degradación del andamio debe coincidir con el crecimiento del nuevo tejido óseo durante su reemplazo.
Propiedades mecánicas	Resistencia mecánica suficiente para proporcionar un apoyo temporal y resistir las fuerzas de carga <i>in vivo</i> . Módulo elástico (300-500 MPa) y resistencia (5-10 MPa) semejantes al hueso trabecular.
Microarquitectura	Estructuras porosas interconectadas con el objeto de distribuir uniformemente las tensiones y facilitar el flujo de células y nutrientes. La microporosidad menor a 10 µm.
Osteoinductividad	Promover la fijación de células específicas y formadoras del tejido óseo.
Porosidad	Volumen y tamaño de los poros para permitir el crecimiento de tejido, la neovascularización, el transporte de masa y la osteogénesis. Es deseable una porosidad mayor del 75%. La macroporosidad de entre 200 y 400 micras para facilitar la unión de células sobre el tejido. La porosidad abierta e interconectada facilita la difusión de los nutrientes esenciales y oxígeno para la supervivencia celular.
Propiedades superficiales	Apropiadas propiedades topográficas y químicas para favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

Tabla 1. Criterios y consideraciones funcionales para el diseño irregular de andamios porosos (IPS) utilizados en Ingeniería de Tejidos Óseos (BTS)

Space-Filling curves (SFC) es una reciente metodología de diseño utilizada en la construcción de andamios porosos con estructura repetitiva a partir de la micro extrusión de un filamento de polímero de pequeño diámetro. Estos métodos permiten fabricar un patrón repetitivo con distinta porosidad en diferentes regiones [11].

Actualmente aplicaciones de código abierto para *Grasshopper*[®] (Rhinoceros 3D[®], *McNeel, USA*) como *Crystallon* permiten crear modelos de celosía interna con este fin (Figura 2).

Las nuevas herramientas de diseño asistido por ordenador, la tomografía computarizada (TC) y la micro-tomografía (μ CT) pueden crear andamios biomiméticos con una estructura irregular idéntica al tejido trabecular óseo (Chen et al., 2007). Sin embargo, tal microestructura requiere de un equipo caro y, en la mayoría de los casos, no es necesario una reproducción tan detallada. En la Figura 3 se muestra la reconstrucción de hueso trabecular de la vértebra L3 humana (ESA29-99-L3) (Beller et al.), con una resolución de 37 μ m, 970 imágenes (2048×2048). La reconstrucción se ha realizado con ScanIP© y ScanFE© (Simpleware Ltd, Exeter, UK).

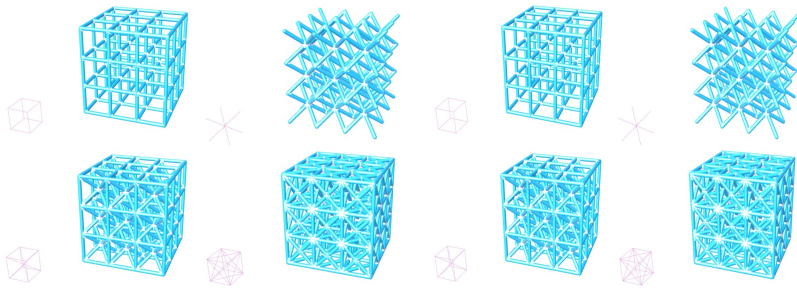


Figura 2. Diseño de andamios para Ingeniería de Tejidos Óseos (BTE) realizados con Crystallon, Grasshopper® (Rhinoceros 3D®, McNeel, USA)

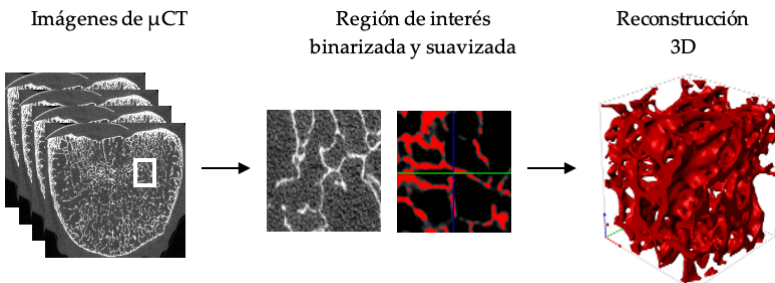


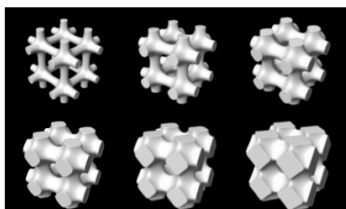
Figura 3. Ejemplo de reconstrucción ósea de una región de interés de vértebra L3 a partir de imágenes μ CT (Gómez et al., 2016)

Fig. 1. A



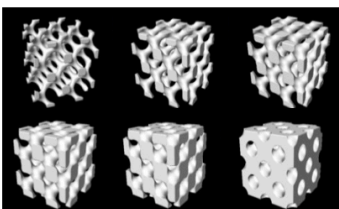
Fig. 1. B

Schwartz primitive



Schwartz W

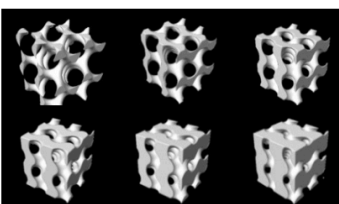
Schwartz diamond



Schoen Gyroid



Neovius' surface



Cylinder Grid

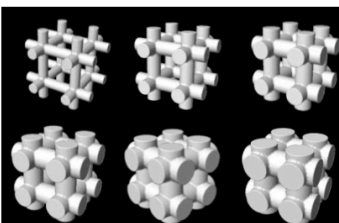
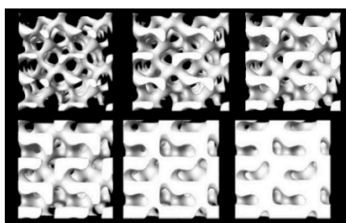


Figura 1. Diseño de andamios para Ingeniería de Tejidos Óseos (BTE). A. Diseño de modelos porosos simples a partir de geometrías primitivas a las que se les han aplicado determinadas operaciones booleanas. B. Implicit Surface Modeling (ISM): Schwartz primitive, Schoen Gyroid, Neovius's surface, Cylinder Grid, etc. de distinta porosidad (1-BV/TV) (Gómez et al., 2016)

Solid Free Form (SFF), también conocido con el nombre de Prototipado Rápido (RP), son nuevas técnicas de fabricación aditiva que permiten obtener estructuras porosas 3D irregulares e interconectadas a partir de modelos CAD tridimensionales. Con estas técnicas, los andamios pueden ser construidos a partir de diferentes técnicas de fabricación aditiva con material biocompatible y bioabsorbible. Los andamios se imprimen capa a capa a partir de la exportación de ficheros STL (STL, *Stereolithography files*). La impresión puede realizarse por distintos procedimientos: térmicos, químicos, mecánicos u ópticos. Algunos de ellos son: *Melt Extrusion* o modelado por deposición fundida (FDM), estereolitografía (SLA) y sinterización selectiva por láser (SLS). En general, las técnicas que utilizan procedimientos ópticos presentan resoluciones más altas. La estereolitografía es una de las tecnologías más antiguas y más precisas de las técnicas de fabricación aditiva (AM) (Ferry et al., 2012).

El hueso trabecular natural no presenta una distribución uniforme en su porosidad. En el núcleo, la porosidad es mayor que en la periferia donde la estructura ósea se presenta de forma más compacta. Además, la forma y distribución de las trabéculas y la forma del poro es muy importante en las propiedades mecánicas y en el transporte de masa (Mathieu et al., 2006). El hueso trabecular no presenta una estructura periódica o regular tal y como se intenta reproducir en la mayoría de las técnicas de modelado de andamios porosos para Ingeniería de Tejidos. La densidad y la forma de la estructura trabecular ósea depende de la tensión a la que están sometidos (Ley Wolf, 1869). Cuando las cargas son iguales en las tres direcciones principales, la estructura ósea tiende a presentar una estructura equiaxial. Cuando la carga principal se encuentra definida en una de las direcciones, la estructura ósea se adapta con el fin de minimizar las tensiones en esa dirección. La densidad relativa del hueso y la porosidad dependen de la magnitud de la distribución de cargas. Por esta razón, varios autores han utilizado el método de Voronoi para imitar la estructura irregular, la forma y la distribución de los poros

y trabéculas en el tejido óseo. Así, se ha empleado el método de Voronoi para distribuir, de forma irregular poros con forma de esfera (Lal & Sun, 2004) y poros de forma irregular (Kou & Tan, 2010). En los modelos de Voronoi 2D y 3D creados por los autores la estructura porosa siempre mantiene una porosidad ($1-BV/TV$), un ancho trabecular ($Tb.Sp$) y una separación trabecular ($Tb.Sp$) constante.

En el presente estudio se propone un nuevo método de diseño de andamios porosos a partir de la aplicación de software de libre uso *Grasshopper*® (*Robert MCNELL & Associates*) con objeto de diseñar estructuras óseas con porosidad irregular e interconectada lo más parecidas posible a la real a partir de la creación de voxels localizados en puntos de nucleación y a partir de la creación de atractores. El presente estudio describe el proceso de diseño del modelo irregular de porosidad variable para diseñar la estructura 3D irregular con la forma externa del defecto adaptado a las necesidades específicas del paciente y la estimación de sus variables histomorfométricas más relevantes como la fracción en volumen (BV/TV) y las relaciones BS/TV y BS/BV .

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño del andamio con porosidad variable por creación de Voxels

Se ha empleado *Grasshopper*® en el diseño de estructuras tridimensionales biomiméticas a partir de la distribución de puntos de nucleación en el espacio que definen los vóxeles finales del modelo poroso. Se pueden emplear distintos procedimientos en la definición de los puntos de nucleación. Uno de ellos genera los puntos de nucleación de los vóxeles a partir de puntos aleatorios mediante la función *Pop3D* de *Grasshopper*®. El procedimiento permite crear andamios con porosidad variable ($1-BV/TV$) y trabéculas interconectadas a partir de la definición de varios volúmenes interconectados con distinto número de puntos de nucleación (Figura 4A). La función *Proximity3D* localiza los puntos más

cercanos a cada uno de los puntos generados y crea una línea de conexión entre ellos. Es posible definir el número de puntos cercanos de conexión que se desea crear. Así, se pueden crear conexiones múltiples entre ellos (1, 2...n). A medida que se definen mayor número de

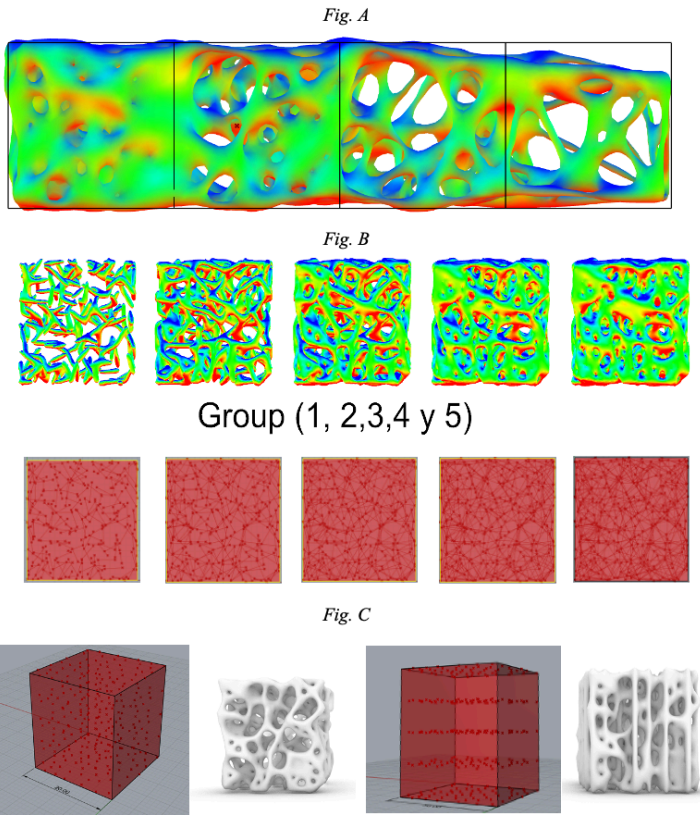


Figura 4. Creación de modelos porosos a partir de la creación de vóxeles. **A.** Modelo con porosidad variable. **A.** Localización y conexión entre puntos cercanos (Proximity3D). **B.** Creación de puntos no aleatorios en la definición de modelos porosos con estructuras de refuerzo en direcciones establecidas.

conexiones entre los puntos más compleja es la estructura final obtenida (Figura 4B). A continuación, mediante la función *Divide Length* se divide el segmento establecido entre cada uno de los puntos. La mayor división de los segmentos crea un mayor número de puntos en cada una de las líneas de división. Estos puntos creados por la división son los que, a partir de la función *Sample Voxel*, genera un vóxel en cada uno de ellos. *Build Isosurface* construye una isosuperficie 3D a partir de los vóxeles (x,y,z) recién creados. La isosuperficie representa un conjunto de niveles de una misma función continua. El suavizado final de la superficie obtenida se genera mediante la función *QuickSmooth*. La creación de modelos porosos siguiendo el procedimiento descrito crea estructuras más o menos isotrópicas. Para la definición de modelos con propiedades anisotrópicas para reforzar la rigidez de la estructura deben crearse una concentración de puntos en la dirección en la que se desea mejorar las propiedades (Figura 5B).

El algoritmo generado al ser paramétrico permite crear una familia de modelos distintos y calcular sus variables histomorfométricas más importantes: fracción en volumen (BV/TV) y las relaciones BS/TV y BS/BV. De esta forma es fácil definir los modelos que maximizan las relaciones deseadas.

2.2. Diseño del andamio con porosidad variable mediante Voronoi

El procedimiento de diseño de andamios a partir de celdas de Voronoi 3D permite definir una estructura con porosidad variable (1-BV/TV) en diferentes regiones volumétricas estando sus trabéculas perfectamente conectadas entre las distintas regiones.

En la Figura 6 se ilustra un ejemplo donde se presentan tres regiones con distinta porosidad. Puede observarse cómo las trabéculas, en las zonas en las que se produce el cambio de la porosidad, se encuentran perfectamente enlazadas garantizando la continuidad de estas. Para

definir los modelos con porosidad variable es necesario crear diferentes volúmenes de interés (VOI) con distinto número de puntos de nucleación. Para cada una de las regiones también es posible regular la porosidad a partir de la definición del ancho trabecular (Tb.Th) y la separación trabecular (Tb.Sp). La creación del modelo 3D se realiza según el modelo de Gómez et al. (2016).

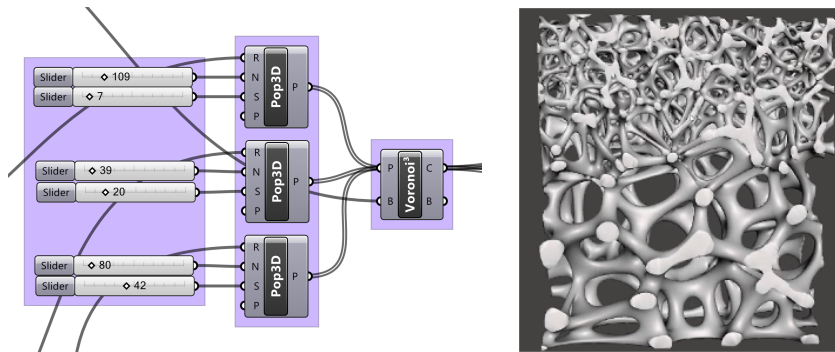


Figura 6. Creación de modelos porosos con porosidad variable e interconectada a partir de la creación de distintos volúmenes de interés con diferente número de puntos de nucleación (Gómez et al., 2016)

2.3. Diseño del andamio con porosidad variable con atractores

El procedimiento se inicia creando una estructura alámbrica que definen las trabéculas del modelo de andamio con la función *Lattice Cell Fill*. El patrón de la estructura también puede crearse de forma manual. Cada una de las líneas generadas son divididas por puntos cuya equidistancia varía a partir del punto atractor localizado en unas coordenadas previamente indicadas. La función *vPoints* crea un volumen a partir de los puntos definidos. Los puntos más cercanos al atractor tienen un diámetro distinto a los alejados según se define con un dominio (*Dom*) y un rango (*Range*). Para finalizar el modelo se emplea la

función *Smooth Volume* que facilita el suavizado final y la función *Volume to Mesh* que crea la malla aproximada a la geometría del volumen definido (Figura 7A y 7B).

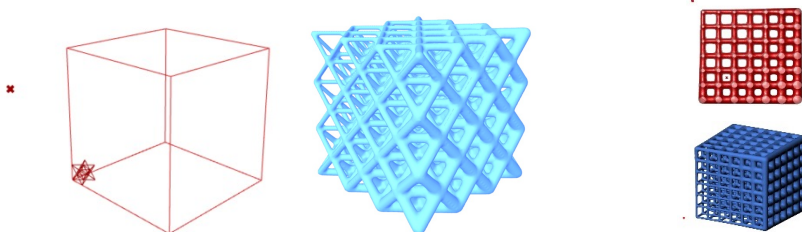


Figura 7A. Creación de modelos porosos con porosidad variable e interconectada a partir de la creación de un punto atractor y la función vPoint.

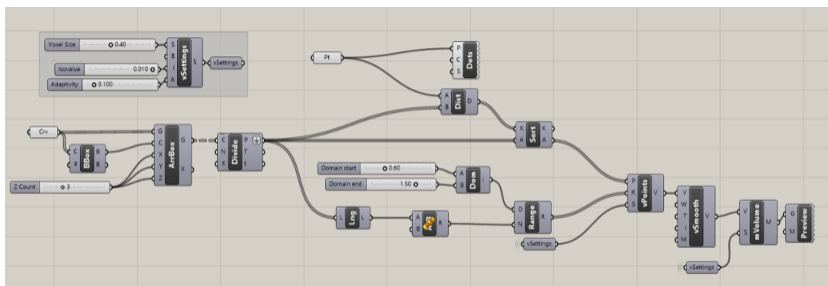


Figura 7B. Algoritmo para la creación de modelos porosos con porosidad variable e interconectada a partir de la creación de un punto atractor y la función vPoint.

2.4. Diseño del andamio adaptado al defecto a rellenar

Con el fin de utilizar los andamios porosos sintéticos como sustitutivo del tejido autólogo se requiere crearlos con las especificaciones microestructurales como BV/TV, Tb.Th y Tb.Sp del tejido a sustituir y con el volumen del defecto óseo. Los algoritmos definidos en los

apartados 2.1, 2.2 y 2.3 permiten generar estructuras con porosidad variable que rellenan volúmenes previamente definidos. De esta forma y a partir de imágenes de tomografía (TC), microtomografía (microCT) o resonancia magnética (RM) del paciente puede obtenerse el volumen tridimensional del defecto a reemplazar y rellenarlo con el patrón con porosidad variable.

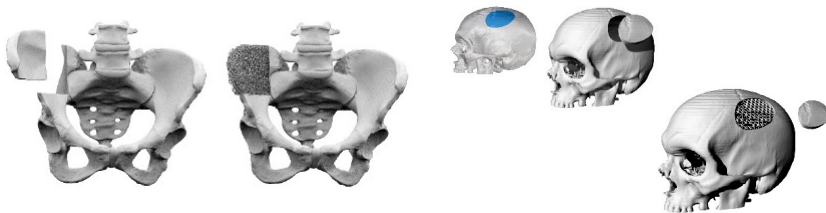


Figura 8. Relleno de macro defectos óseos a partir de la reconstrucción de las imágenes médicas

4. Conclusiones

Los algoritmos presentados permiten crear modelos con porosidad variable e interconectada entre diferentes volúmenes de interés (VOI) con conexiones perfectas entre las trabéculas generadas. Además, pueden rellenar cualquier volumen que represente un macro defecto óseo obtenido del propio paciente a partir de la reconstrucción previa de sus imágenes DICOM (CT, microCT o RMN). En el presente estudio no se ha realizado una validación de las propiedades mecánicas y fluidicas necesarias para confirmar su aptitud para el soporte mecánico, la adhesión y el crecimiento celular. Sin embargo, estudios previos confirman que los modelos son aptos y cumplen con los requerimientos. Las nuevas técnicas de fabricación aditivas (AM) pueden ser utilizadas para generar andamios a partir de la exportación de archivos STL (estereolitografía) de los modelos creados.

Referencias

- 3DKSurf, Abderrahman Taha (<http://k3dsurf.sourceforge.net/>).
- Beller, G., Burkhart, M., Felsenberg, D., Gowin, W., Hege, H.C., Koller, B. Et al. (2005). *Vertebral Body Data Set ESA29-99-L3*. <http://bone3d.zib.de/data/2005/ESA29-99-L3/>
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 546–554.
- Cheah, C.M., Chua, C.K., Leong, K.F., & Chua, S.W. (2003). Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 1: Investigation and Classification. *Advanced Manufacturing Technology*, 21, 291–301.
- Chen, Z., Su, Z., Ma, S., Xiaoling Wu, X., & Luo, Z. (2007). Biomimetic modeling and three-dimension reconstruction of the artificial bone. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 88, 123–130.
- Gómez, S., Vlad, M.D., López, J., & Fernández, E. (2016). Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 15(42), 341–350.
- Hollister, S.J. (2006). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 2006, 518–524.
- Hoque, M.E., Chuan, Y.L., & Pashby, I. (2012). Extrusion based rapid prototyping technique: An advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers*, 97, 83–93.
- Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C., & Lim, T.C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J. Tissue Eng Regen Med.*, 1, 245–260.
- Hutmacher, D.W., Sittinger, M., Risbud, M.V. (2004). Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication. *Trends Biotechnol.*, Jul 22(7), 354–362.
- Kapfer, S.C., Hyde, S.T., Mecke, K., Arns, C.H., & Schröder-Turk, G.E. (2011). Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 6875–6882.
- Kou, X.Y. & Tan, S.T. (2010). A simple and effective geometric representation for irregular porous structure modelling. *Computer-Aided Design.*, 42, 930–941.
- Lal, P., & Sun, W. (2004). Computer modeling approach for microsphere-packed bone scaffold. *Computer-Aided Design.*, 36, 487–497.
- Mathieu, L.M., Mueller, T.L., Bourban, P.E., Pioletti, D.P., Müller, R., & Manson, J-A. E. (2006). Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 905–916.
- Melchels, F. P.W., Feijen, J., Grijpma, D. W. (2012). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*, 37, 1079–1104.

- Olivares, A.L., Marsal, È., Planell, J.A., & Lacroix, D. (2009). Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. *Biomaterials*, 30, 6142–6149.
- Schoen, A.H. (1970). *Nasa Technical Note*. NASA-TN-D-5541.
- Yoo, D-J. (2011). Computer-aided porous scaffold design for tissue engineering using triply periodic minimal surfaces. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 12, 61–71.