

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
DIPARTIMENTO DI  
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE  
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Analisi dello stato dell'arte di scaffold biomimetici  
mediante l'utilizzo di tecnologie additive per la  
rigenerazione del tessuto osseo

Elaborato in  
Biomateriali e comportamento meccanico dei biomateriali

Relatore  
Dott. Alberto Sensini

Presentata da  
Perla Tani

Correlatori  
Prof. Luca Cristofolini  
Prof. Andrea Zucchelli

Anno Accademico 2020/2021

## SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	
1.1 Composizione dell'osso.....	5
1.2 Cellule ossee.....	7
1.3 Proprietà meccaniche del tessuto osseo.....	9
1.4 Medicina rigenerativa.....	10
1.5 Ingegneria Tissutale.....	12
1.6 Biomateriali utilizzati in ingegneria tissutale.....	13
1.7 Tecniche di realizzazione di scaffold.....	17
1.8 Geometrie degli scaffold ossei.....	22
2. SCOPO DELLA TESI.....	25
3. METODI DELLA RICERCA.....	25
4. RISULTATI E DISCUSSIONI	
4.1 Geometria cubica semplice.....	26
4.2 Geometria cubica a faccia centrata/a diamante.....	30
4.3 Geometria cubica a corpo centrato.....	34
4.4 Geometria a dodecaedro rombico.....	37
4.5 Geometria a traliccio di otetto.....	38
4.6 Geometria a cubo troncato.....	40
4.7 Superfici minime triplamente periodiche.....	41
4.8 Tassellatura Voronoi.....	45
5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	53

## *Abstract (ITA)*

Ogni giorno, nel mondo, si verificano migliaia di fratture ossee e la maggior parte di esse, con il passare del tempo, riescono a rimarginarsi in modo autonomo. In casi più importanti, le fratture ossee necessitano di interventi chirurgici. Per queste motivazioni, affianco ad autoinnesti, alloinnesti e xenoinnesti, negli ultimi anni si è iniziato a parlare in modo sempre più frequente di ingegneria tissutale. In questo tipo di ingegneria, vengono sviluppate delle impalcature (scaffold) in grado di mimare il tessuto osseo naturale. Lo scopo di questa tesi è analizzare le varie tipologie di produzione di scaffold ossei che si ottengono attraverso la tecnologia della stampa 3D. Nella parte introduttiva dell'elaborato, viene inserita una descrizione del tessuto osseo visto sia dal punto di vista cellulare e della composizione, sia dal punto di vista delle proprietà meccaniche. Successivamente, parlando di medicina rigenerativa, vengono descritti i mezzi di osteosintesi, gli innesti e gli scaffold da impiantare nel sito di interesse. In particolare, gli scaffold devono soddisfare diversi requisiti, tra cui la biomimeticità, la compatibilità con l'attività cellulare, requisiti di progettazione e proprietà meccaniche adeguate. Tali scaffold possono essere realizzati attraverso diverse geometrie interne. Nella seconda parte dell'elaborato, infatti, vengono analizzate le diverse geometrie sviluppate per produrre questi dispositivi, attraverso un'accurata analisi della letteratura. Per i vari articoli analizzati sono stati investigati i metodi di produzione e i risultati ottenuti confrontando vantaggi e svantaggi fra le differenti geometrie.

## *Abstract (ENG)*

Every day, in the world, thousands of bone fractures occur and most of them, over time, are not able to heal on their own. In fact, often bone fractures require surgery. For these reasons, alongside autografts, allografts, and xenografts, in recent years it has begun to talk more frequently about tissue engineering. In this type of engineering, scaffolds able to mimic the structure and properties of natural bone tissue, are developed. The purpose of this thesis is to analyze the different types of 3D printing geometries developed to produce bone tissue-inspired scaffolds. Firstly, the thesis introduces a description of the bone tissue ranging from the cellular, structural and mechanical point of view. Then, an overview on the regenerative medicine and the requirements of grafts and scaffolds is described. These scaffolds can be made with different internal geometries that are described in deep in the second part of the thesis. Here, a comprehensive analysis of the literature is developed to investigate the properties of this geometries. For the various articles analyzed, the production methods and the results obtained were investigated comparing the advantages and disadvantages between the different 3D printing geometries.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Composizione dell'osso

Lo scheletro umano adulto è composto da 213 ossa. L'osso è un tessuto connettivo metabolicamente attivo che fornisce supporto strutturale e protezione delle strutture vitali, facilita il movimento fornendo leve per i muscoli e funge da serbatoio per minerali e fattori di crescita [1]. L'osso è composto da una componente organica e una inorganica. Il substrato organico è composto in gran parte da collagene di tipo I (40% in volume), la proteina più abbondante nel corpo umano, inframmezzato da cristalli minerali composti da idrossiapatite di calcio ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) - 45%), un composto di ioni calcio e fosfato. Il volume rimanente (15%) è occupato da acqua legata al collagene o risiedente negli spazi del sistema lacunocanicolare. Questa combinazione conferisce all'osso le sue proprietà meccaniche ed è responsabile delle proprietà viscoelastiche del materiale [2]. I componenti dell'osso si assemblano gerarchicamente per fornire la rigidità, che serve per il supporto, e la tenacità, che permette la resistenza agli urti. Per questo motivo si è dimostrato che il minerale osseo è assemblato gerarchicamente a partire dalla nanoscala [3]. I due principali tipi strutturali di osso sono l'osso corticale o compatto e l'osso spugnoso o trabecolare. Sebbene entrambi abbiano la stessa composizione complessiva della matrice, differiscono significativamente per densità o porosità, struttura tridimensionale e attività metabolica. Questi tre fattori influenzano in larga misura la loro funzione e fisiologia [1]. Le ossa possono essere classificate in diversi modi: secondo posizione, forma, consistenza o dimensione. La classificazione più utilizzata in letteratura divide le ossa in tre categorie: i) ossa piatte, ad esempio quelle principalmente dello scheletro facciale-cranico; ii) ossa lunghe, ad esempio le ossa lunghe degli arti, le clavicole e costole; iii) le ossa tubolari corte/larghe come, ad esempio, le ossicine delle mani e dei piedi (metacarpi, metatarsi e falangi) e le vertebre. Le ossa lunghe sono composte da tre regioni distinte: i) una regione centrale chiamata diafisi, un struttura cava composta principalmente da osso corticale che accoglie nella cavità interna il midollo osseo; ii) le metafisi, poste tra diafisi ed epifisi, sono costituite da uno strato sottile d'osso compatto e da una massa di tessuto spugnoso (rappresentano regioni di accrescimento osseo e fino all'età di 18 anni sono costituite da un disco di cartilagine ialina che viene progressivamente mineralizzata per consentire la crescita dell'osso); iii) epifisi, regioni adiacenti alle metafisi contenenti la superficie articolare, che sono in gran parte costituite da osso spugnoso circondato da un sottile guscio corticale. Le ossa piatte non contengono diafisi, metafisi o epifisi e sono per lo più osso spugnoso con gusci corticali sottili [4]. L'osso corticale è denso e solido e circonda lo spazio del midollo, mentre l'osso trabecolare è composto da una rete a nido d'ape di placche trabecolari e bastoncelli intervallati nel compartimento del midollo osseo [4].

L'osso corticale è costituito da lamelle ossee concentriche costituite da fibre di collagene e idrossiapatite (detti osteoni) tenuti assieme tra loro da zone altamente mineralizzate dette linee cementanti. La lamella ossea è formata da fibrille di collagene parallele sovrapposte concentricamente su più strati e da una sostanza amorfa, che è in parte organica e in parte inorganica. Nell'adulto le lamelle si organizzano in osteoni, cilindri ossei consolidati intorno ad un canale centrale contenente un vaso sanguigno, detto canale di Havers. La struttura corticale dell'osso è tale da permettere un'elevata vascolarizzazione del tessuto osseo rendendo possibile la nutrizione e l'innervazione del tessuto fino agli strati più profondi. Il tessuto spugnoso è formato da lamine ossee unite fra loro a costruire un sistema di cavità interconnesse. Si tratta di un'architettura caratterizzata da elevata porosità che presenta un maggior rapporto superficie/volume ed ha elevata resistenza alla compressione [5].

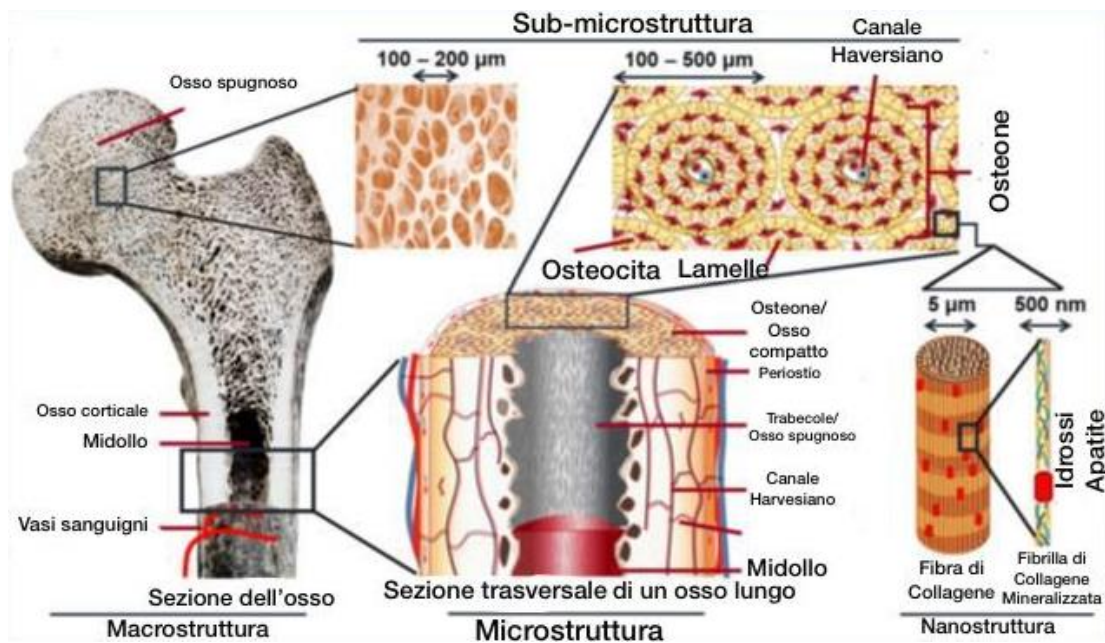


Figura 1: Struttura e componenti dell'osso. Vista in sezione trasversale dei componenti strutturali dell'osso corticale e spugnoso. Adattata da [6].

Questa struttura organizzata gerarchicamente ha una disposizione e un orientamento irregolari dei componenti, ma ottimizzati, rendendo il materiale osseo eterogeneo e anisotropo [5].

## 1.2 Cellule ossee

Nell'osso sono presenti in prevalenza tre tipologie di cellule: osteoblasti, osteoclasti e osteociti. Tali cellule hanno origini diverse [7]. Gli osteoblasti sono le cellule che formano l'osso secernendo matrice ossea organica non mineralizzata (osteoidi) la quale si mineralizza dando origine all'osso maturo. Sono cellule ossee di origine mesenchimale ovvero hanno origine dal mesoderma, un foglietto embrionale da cui origina tutto l'apparato muscoloscheletrico, le cellule del sangue e altri organi. Le cellule mesenchimali sono cellule staminali adulte che possono differenziarsi in tutti i tessuti di origine mesodermica [7]. Dopo la loro attivazione possono essere soggetti ad apoptosi, diventare osteoblasti inattivi o cellule del rivestimento osseo, oppure possono inglobarsi nella matrice ossea da essi prodotta, diventando osteociti [8]. Le proteine e i fattori di crescita sono degli importanti mediatori della differenziazione degli osteoblasti. Gli osteociti rappresentano il 90% delle cellule ossee. Queste cellule sono osteoblasti quiescenti. Quando la matrice ossea viene mineralizzata, gli osteoblasti vengono incorporati nella fase minerale e si trasformano in osteociti [9]. I microdanni ossei vengono rilevati dagli osteociti che rispondono dando inizio al processo di rimodellamento [10]. Infine, gli osteoclasti sono cellule ossee di origine ematopoietica che riassorbono l'osso grazie alla secrezione di sostanze come, ad esempio, la proteasi, un enzima in grado di spezzare i legami peptidici delle proteine [7]. L'osso è l'unico tessuto che ha come proprietà il rimodellamento. Questo processo è fondamentale per diversi motivi tra cui: la rimozione dell'osso primario e infantile e la deposizione dell'osso secondario, il rinnovo dell'osso vecchio, la rimozione e la sostituzione dell'osso ischemico o microfratturato e la regolazione dell'omeostasi del calcio. Il rimodellamento osseo si fonda sul corretto equilibrio tra riassorbimento del tessuto da parte degli osteoclasti e la deposizione di nuova matrice extracellulare da parte degli osteoblasti, le cui funzioni devono essere strettamente connesse quantitativamente, temporalmente e spazialmente [8]. Il ciclo di rimodellamento osseo si verifica in più settimane ed è composto da cinque fasi: attivazione, riassorbimento, inversione, formazione e cessazione. I cluster di osteociti e osteoblasti, coinvolti in questo processo, in ciascuna area dell'osso che sta subendo un rimodellamento, sono disposti all'interno di strutture anatomiche temporanee note come "unità multicellulari di base" (BMU). Ogni BMU è racchiusa da cellule del rivestimento osseo che creano un ambiente unico per lo svolgimento del processo. Durante il rimodellamento fisiologico dell'osso, il suo volume non cambia. La disposizione ordinata delle cellule all'interno della BMU è fondamentale per garantire la corretta sequenza delle fasi del rimodellamento osseo [10]. Il segnale d'inizio di questo processo viene rilevato dall'osso. Questo segnale può essere sia ormonale che meccanico poiché anche le forze fisiche che causano deformazioni meccaniche e microdanni allo scheletro vengono tradotti in segnali biologici che possono essere rilevati dagli osteociti. Dopo il

rilevamento del segnale, le cellule del rivestimento osseo si ritraggono e la membrana endossea viene digerita. A sua volta i precursori degli osteoclasti vengono reclutati e attivati. Successivamente, gli osteoclasti si differenziano e si attaccano alla superficie ossea avviando il riassorbimento attraverso la produzione di ioni idrogeno ed enzimi in modo da scomporre la matrice ossea. Il riassorbimento osseo mediato da osteoclasti dura circa 2-3 settimane durante ogni ciclo di rimodellamento [8,10]. Inoltre, sulla superficie dell'osso trabecolare, si formano cavità chiamate lacune di Howship. Gli osteoclasti subiscono l'apoptosi terminando la fase di riassorbimento. Dopo il riassorbimento osseo, le cavità contengono una varietà di cellule, tra cui osteociti e pre-osteoblasti, reclutate per iniziare la formazione ossea. I segnali di accoppiamento che collegano la fine del riassorbimento osseo e l'inizio della formazione ossea sono ad oggi sconosciuti. Gli osteoclasti vengono sostituiti dagli osteoblasti che iniziano la formazione ossea. La completa formazione dell'osso può richiedere dai 4 ai 6 mesi. Gli osteoblasti sintetizzano la nuova matrice extracellulare per riempire le cavità lasciate dagli osteoclasti. Questa nuova matrice ossea (osteoid) è composta da proteine come il collagene di tipo I. Nel momento in cui la nuova matrice ossea si mineralizza, gradualmente, si forma nuovo osso. Dopo il completamento della formazione ossea, la maggior parte degli osteoblasti subiscono apoptosi mentre il restante diventa osteociti o cellule del rivestimento osseo quiescenti che coprono completamente la superficie ossea appena formata. La fase finale di questo processo è la mineralizzazione (o calcificazione) che inizia circa 30 giorni dopo la formazione dell'osteoid. Nell'osso trabecolare questo processo termina 90 giorni dopo la deposizione osteoid, mentre nell'osso corticale termina in circa 130 giorni. Successivamente, l'osso entra nella fase di quiescenza e la quantità di osso formata diventa uguale a quella riassorbita [7,8,10].

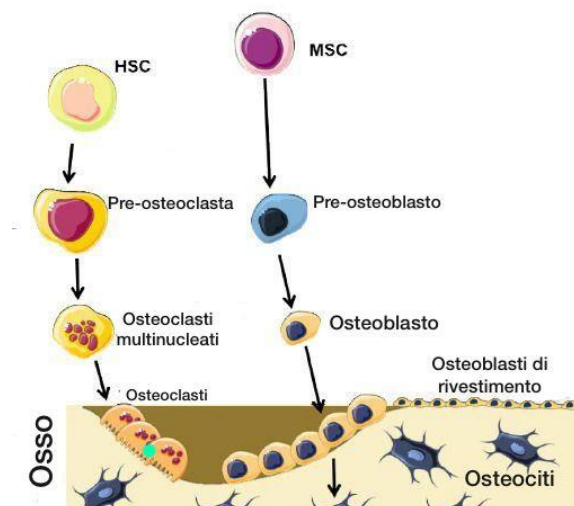


Figura 2. Rappresentazione schematica del processo di differenziazione delle cellule ossee, generate da cellule staminali mesenchimali ed ematopoietiche. Adattato da [11].



### 1.3 Proprietà meccaniche del tessuto osseo

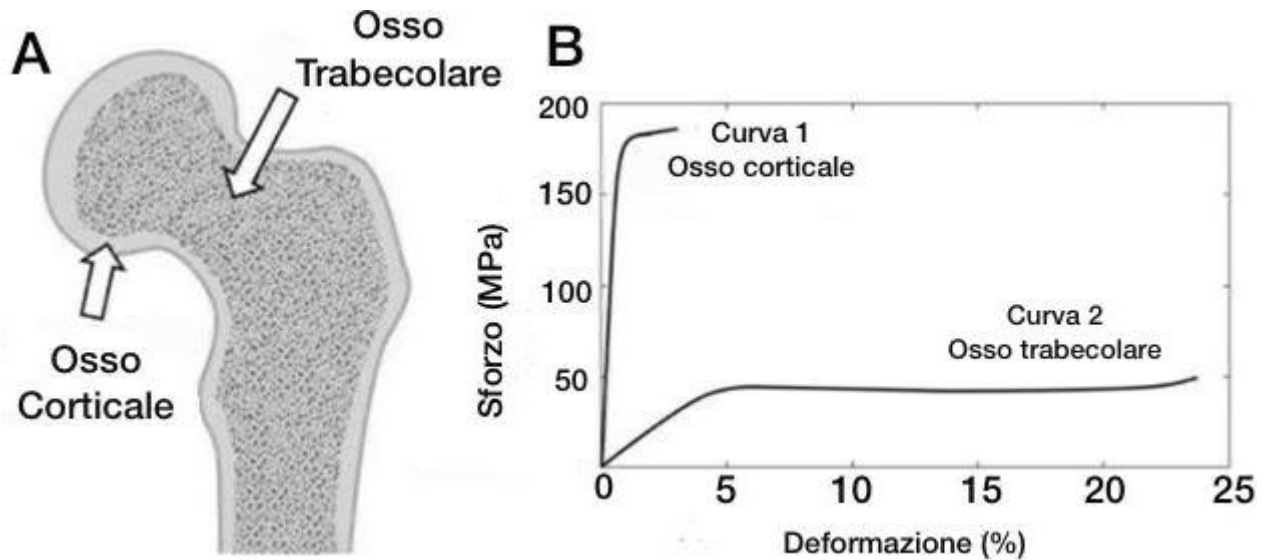


Figura 3. A) Il tessuto osseo può essere classificato in osso corticale e osso trabecolare, B) Le curve forza-deformazione dell'osso corticale e trabecolare. L'ultimo punto della curva è il punto di rottura. Adattato da [12].

La porosità è uno dei fattori che influenzano fortemente le proprietà meccaniche dell'osso. Pertanto, il tessuto osseo corticale e trabecolare hanno proprietà meccaniche significativamente diverse. Questa diversità è causata dalla loro differenza di porosità. L'osso corticale può sopportare una tensione di rottura molto più elevata (fino a circa 150 MPa) ma una deformazione inferiore (fino a circa il 3%) prima del cedimento, mentre l'osso trabecolare può sopportare uno stress inferiore (fino a circa 50 MPa) ma una deformazione molto più elevata (fino a circa il 50%) prima del fallimento. Dal punto di vista compositivo, i componenti inorganici dell'osso, come l'idrossiapatite, rendono l'osso rigido e forte, mentre i componenti organici, ovvero il collagene, offrono flessibilità, duttilità e tenacità. Pertanto, il comportamento meccanico complessivo dell'intero osso è la combinazione di questi due diversi comportamenti, che rendono l'osso rigido e resistente ma allo stesso tempo flessibile e duttile. Questo comportamento meccanico specializzato rende l'intero osso un tessuto versatile con molteplici funzioni meccaniche, come supporto, protezione e assorbimento degli urti [12].

Tabella 1. Proprietà meccaniche dell'osso compatto e dell'osso trabecolare.

	Modulo di Young (GPa)	Tensione di Rottura (MPa)	Deformazione di Rottura (%)	Riferimenti
<i>Osso corticale</i>	1-20	82.9-150.6	1.0-3.1	[13-15]
<i>Osso trabecolare</i>	0.1-1.0	0.06-20.8	0.49-26.8	[14-16]

Il rimodellamento osseo è importante per preservare la sua resistenza meccanica poiché sostituisce l'osso più vecchio e danneggiato con un osso più nuovo e sano. Tale rimodellamento è essenzialmente lo stesso sia nell'osso corticale sia nell'osso trabecolare [10]. Come detto precedentemente, l'osso trabecolare, come l'osso corticale, è costituito principalmente da idrossiapatite, collagene e acqua. Tuttavia, l'osso trabecolare ha un contenuto di calcio inferiore rispetto all'osso corticale ma ha un contenuto di acqua più elevato (27% rispetto al 23% per l'osso corticale). Il tutto è coerente con il fatto che l'osso trabecolare è più attivo nel rimodellamento e di conseguenza meno mineralizzato [17]. Il rimodellamento accoppia il riassorbimento osseo e la formazione ossea preservando la funzione scheletrica per tutta la vita. La migliore comprensione di questo processo e il suo ruolo nel mantenimento della forza ossea ha portato allo sviluppo di una varietà di approcci terapeutici per malattie ossee che mirano a diverse fasi del processo di rimodellamento osseo [10].

#### *1.4 Medicina Rigenerativa*

A livello globale, nel 2019, si sono verificate 178 milioni di nuove fratture (con un aumento del 33.4% dal 1990). Le fratture della parte inferiore della gamba, della rotula, della tibia, del perone e della caviglia sono state le fratture più comuni nel 2019, con un tasso di incidenza standardizzato per età di 419.9 casi per 100 000 abitanti [18].

La medicina rigenerativa è un ampio campo interdisciplinare definito dall'obiettivo di ricostruire, riparare o sostituire il tessuto mancante o danneggiato in uno stato il più vicino possibile alla sua architettura e funzione originaria [19]. Per quanto riguarda le fratture classiche, i margini di frattura si consolidano senza necessità di mezzi di osteosintesi. Questi ultimi sono, invece, necessari nel caso in cui i margini di frattura non siano in contatto. In ambito ortopedico, per quanto riguarda i traumi fisici, per l'osteosintesi vengono comunemente utilizzati impianti come viti, placche e/o chiodi in quanto garantiscono la stabilità dell'area fratturata e contribuiscono alla guarigione dell'osso [20]. Le miniplacche sono state inizialmente sviluppate come target per le fratture del piede e della mano, ma sono state utilizzate anche nel trattamento della fissazione di piccoli frammenti ossei, nella riduzione delle fratture delle ossa lunghe e nel trattamento della pseudoartrosi, che è difficile da trattare [21]. Questi mezzi di osteosintesi possono essere di vari materiali. L'acciaio inossidabile e il titanio sono i materiali più diffusi però sono disponibili anche impianti riassorbibili come, ad esempio, l'acido poliglicolico (PGA) e l'acido polilattico (PLA). I polimeri riassorbibili sono in grado di mantenere le loro proprietà meccaniche per settimane e vengono degradati gradualmente durante la guarigione ossea in componenti compatibili con i tessuti che vengono facilmente assorbiti dall'organismo, trasferendo così lentamente lo stress al sito della frattura. L'uso di mezzi biorassorbibili bypassa le complicazioni associate agli impianti metallici come la corrosione, le infezioni, le fratture da stress e

la necessità di rimozione dell'impianto, diminuendo così la morbilità del paziente e i costi di follow-up [22]. Nelle fratture patologiche o di grandi dimensioni, in cui la rigenerazione ossea non avviene a causa di insufficiente apporto di sangue, insufficiente stimolazione meccanica, infezioni dell'osso o dei tessuti circostanti [21] oppure nel caso in cui le estremità ossee si rimarginino separatamente senza rigenerare la continuità tra le estremità fratturate (pseudoartrosi), nasce la necessità di un innesto osseo. Dopo il sangue, l'osso è il secondo tessuto più comunemente trapiantato nell'essere umano. Un innesto osseo è definito come un materiale impiantato che promuove la guarigione ossea in autonomia o in combinazione ad altri materiali, attraverso l'osteogenesi, l'osteoiduzione e osteoconduzione [21]. L'osteogenesi è la capacità di produrre nuovo osso da parte degli osteoblasti ottenuti per differenziazione delle cellule osteoprogenitrici presenti nell'osso ricevente o provenienti dal materiale dell'innesto. L'osteoiduzione è la capacità dei materiali dell'innesto di indurre la formazione delle cellule che formano l'osso. Attraverso questo processo viene indotta l'osteogenesi che è un fenomeno che si osserva in qualsiasi tipologia di guarigione ossea. L'osteconduzione comporta la crescita dell'osso su una superficie. Attraverso questo processo l'innesto agisce come un'impalcatura permanente e riassorbibile che sostiene la crescita di vasi e la nascita di nuovo osso dai bordi del difetto all'interno e sulle sue superfici. Questo fenomeno si può osservare regolarmente in caso di impianti ossei [21,23]. La scelta di un innesto osseo ideale si basa su diversi fattori come, ad esempio, la vitalità dei tessuti, le dimensioni del difetto, la forma e il volume dell'innesto, le caratteristiche biomeccaniche, la manipolazione dell'innesto, il costo, le questioni etiche, le caratteristiche biologiche e le relative complicazioni. Gli innesti ossei possono essere corticali, spongiosi o corticospongiosi. Gli innesti corticali sono usati per il supporto strutturale mentre gli innesti spongiosi vengono utilizzati per l'osteogenesi. Il supporto strutturale e l'osteogenesi possono essere combinati utilizzando innesti ossei cortico spongiosi. Gli innesti ossei possono essere suddivisi in diverse categorie, tra cui autoinnesti, alloinnesti e xenoinnesti. Inoltre, possono essere utilizzati altri materiali per l'innesto, come ad esempio i biomateriali sintetici a base biologica, i biomateriali di ingegneria tissutale e le loro combinazioni. Ognuna di queste opzioni presenta vantaggi e svantaggi. Gli autoinnesti sono il "gold standard" nella ricostruzione di piccoli difetti ossei e hanno una forte osteogenesi [24]. Gli svantaggi sono principalmente il dolore, la morbilità del sito donatore e le lesioni ai vasi principali o viscerali durante il prelievo. Per questi motivi sono state introdotte e testate diverse alternative. Gli alloinnesti sono un'opzione con importanti limitazioni associate al rigetto, alla trasmissione di malattie e ai costi. Questa tipologia di trapianti ha proprietà di incorporazione inferiori con i tessuti dell'ospite rispetto agli autoinnesti. Gli xenoinnesti, oltre agli svantaggi degli alloinnesti, possono portare alla trasmissione di malattie zoonotiche e, per questo motivo, il rigetto dell'innesto è più probabile e aggressivo [21]. Quindi in alloinnesti e xenoinnesti il tessuto donatore deve prima

andare incontro a trattamenti, come la decellularizzazione e la sterilizzazione, per evitare di incorrere in rigetto ed infezioni. Tuttavia, tali processi di trattamento dell'incorporazione dell'innesto influiscono sulla resistenza strutturale [25]. Questi sono i motivi per i quali, nell'ultimo decennio, è stata introdotta l'ingegneria dei tessuti [21].

### *1.5 Ingegneria tissutale*

Utilizzando tecniche di ingegneria tissutale, è possibile progettare impalcature (in inglese scaffold) di materiale sintetico o naturale, con l'obiettivo di ridurre gli svantaggi degli innesti tradizionali. Nonostante ciò, l'ingegneria dei tessuti presenta dei limiti. Alcuni aspetti importanti dell'interazione del corpo con l'innesto ospite e della risposta immunitaria a questi impianti non sono ancora chiari [21]. Lo scaffold è un ponteggio poroso, che funge da modello tridimensionale per l'attaccamento cellulare iniziale e la successiva formazione di tessuto sia in vitro che in vivo. Lo scaffold fornisce il supporto necessario affinché le cellule si attacchino, proliferino e mantengano la loro funzione differenziata. La sua architettura definisce la forma definitiva del tessuto che viene rigenerato [26]. Dal punto di vista biologico, gli scaffold supportano lo sviluppo in vivo di una matrice extracellulare in tessuti danneggiati e consentono sia l'afflusso di sostanze nutritive dal tessuto circostante che l'eliminazione delle sostanze di scarto prodotte dalle cellule nel tessuto. Gli scaffold sono strutture 3D composte da materiali progettati per suscitare risposte cellulari specifiche. All'interno di queste strutture possono essere inseriti agenti biologici per manipolare i processi cellulari. La rigenerazione ossea è un meccanismo complesso e per questo motivo ci sono diversi requisiti per la progettazione di scaffold. Innanzitutto, gli scaffold devono essere biomimetici, ovvero devono possedere una struttura e una composizione chimica il più possibile simile al tessuto da rigenerare [27]. In secondo luogo, gli scaffold devono essere compatibili con la normale attività cellulare senza suscitare o evocare risposte avverse locali o sistemiche nell'ospite. I biomateriali devono essere metabolizzati ed eliminati dal corpo. Il tasso di degradazione del biomateriale è una caratteristica molto cruciale. Il biomateriale deve subire il riassorbimento man mano che si forma nuova matrice cellulare, ovvero la velocità di formazione del nuovo tessuto osseo deve essere proporzionale alla velocità di degradazione del biomateriale [28]. Inoltre, gli scaffold devono soddisfare determinati requisiti di progettazione per ripristinare le funzioni del tessuto osseo e devono presentare ottime caratteristiche biochimiche e porosità per consentire l'infiltrazione di cellule staminali mesenchimali locali (o impiantate) e di altre cellule osteoprogenitrici. Infine, tali scaffold devono mostrare proprietà meccaniche il più simili possibile a quelle dei tessuti ossei bersaglio [27]. Queste impalcature vengono valutate in ambienti in vitro con varie composizioni di terreni di coltura, stimoli meccanici, temperature e attività cellulare che influenzano la crescita

di nuovo tessuto osseo. La fattibilità dell'utilizzo di uno scaffold viene determinata considerando i processi di rigenerazione ossea che avvengono in vivo in base a sesso, età, dimensione, tipologia di difetto osseo, stimoli meccanici e biochimici, vascolarizzazione, processi infiammatori e immunologici previsti durante la rigenerazione ossea utilizzando uno scaffold [27].

### *1.6 Biomateriali utilizzati in ingegneria tissutale*

Per sviluppare gli scaffold, utilizzati nell'ambito della medicina rigenerativa del tessuto osseo, i biomateriali possono essere di diverso tipo: naturali, sintetici, ceramici, metallici e i loro composti [27]. I biomateriali di origine naturale, come collagene, chitosano, acido ialuronico, alginato e fibrina, sono biomateriali prodotti da organismi viventi. Questi biomateriali sono intrinsecamente biocompatibili e ampiamente utilizzati nella fabbricazione di scaffold. Il collagene è il principale componente proteico della matrice extracellulare e mostra un'eccezionale biocompatibilità [29,30]. Questo biomateriale è il più utilizzato nelle applicazioni biomediche. Nonostante ciò, andando spesso incontro a processi chimici durante la sua preparazione, può ridurre le proprie proprietà meccaniche [27]. Anche il chitosano, derivante dai crostacei, è un biomateriale molto utilizzato [27,29,30]. Esso è un materiale biodegradabile, biocompatibile, non antigenico, non tossico e biofunzionale. L'acido ialuronico è un biomateriale di origine naturale che si trova nella maggior parte dei tessuti connettivi del corpo, tra cui la pelle, la cartilagine e l'umor vitreo. Esso svolge diverse funzioni fisiologiche, tra cui la regolazione dell'acqua nei tessuti, e per questo motivo, tale biomateriale può essere ampiamente utilizzato per formare scaffold con proprietà strutturali e di riempimento degli spazi [27,29]. L'alginato è un biomateriale utilizzato per creare scaffold biomimetici, biocompatibili e biodegradabili. Esso è un polisaccaride isolato dalle alghe brune che si trovano nelle acque costiere di tutto il mondo [31]. Un altro importante biomateriale è la fibrina, la quale è composta da due componenti principali: fibrinogeno e trombina purificata. Poiché la fibrina è completamente biodegradabile e altamente angiogenica, essa, è un materiale promettente per la fabbricazione di scaffold per la rigenerazione dei tessuti e la cicatrizzazione delle ferite. Altri biomateriali di origine naturale includono proteine, albumina, gelatina, eparina, seta, condroitina 6-solfato e derma acellulare [27]. La seta è un biopolimero proteico naturale composto principalmente da proteine, polisaccaridi e lipidi. Essa viene filata in fibre da alcune larve, tra cui bachi da seta, alcuni aracnidi e mosche. La seta è biocompatibile ed evoca una risposta immunitaria paragonabile ad impianti medici consolidati [30]. Per la creazione di scaffold ossei, oltre ai materiali di origine naturale, possono essere utilizzati anche materiali sintetici. La maggior parte dei materiali sintetici attualmente disponibili è stata sottoposta a numerosi test preclinici per verificare le loro reazioni immunitarie clinicamente significative. La

natura della reazione infiammatoria dipende in gran parte dalla composizione, dalle dimensioni e dalle proprietà superficiali del materiale sintetico. La maggior parte dei materiali attualmente disponibili sono osteoconduttivi e non provocano una reazione infiammatoria clinicamente importante nel momento dell'inserimento [32]. I biomateriali sintetici devono mostrare una composizione coerente e nessuna variazione da lotto a lotto, consentire la produzione su larga scala, essere utilizzati per creare forme geometriche progettabili precise, essere personalizzati con un'ampia gamma di proprietà meccaniche e indurre risposte immunitarie minime. Biomateriali polimerici sintetici come l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), i loro copolimeri come l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) e altri sono i materiali più utilizzati per fabbricare scaffold biomimetici per la rigenerazione del tessuto osseo. Il PLA ha due forme enantiomeriche: acido poli(L-lattico) (PLLA) e acido poli(D-lattico) (PDLA) [33]. Il PLLA è un polimero sintetico biodegradabile e biocompatibile che viene usato come scaffold di ingegneria tissutale per le sue buone prestazioni biomediche [34]. Le sue proprietà termiche e meccaniche, però, sono scarse e, in qualche modo, eliminano la sua applicazione come materiale strutturale ordinario, quindi viene utilizzato il PDLA come materiale di rivestimento del PLLA perché ne migliora la termostabilità e le proprietà meccaniche [35]. Il policaprolattone (PCL) è un altro biomateriale biodegradabile che è considerato compatibile con i tessuti molli e duri e mostra una biocompatibilità simile a quella di PLA, PGA e PLGA. Anche se la maggior parte dei biomateriali di origine naturale sono altamente biocompatibili e PLA, PGA, PLGA e PCL possono essere facilmente formati in scaffold, i soli biomateriali sono limitati nella loro applicabilità alla rigenerazione ossea a causa di loro bassa capacità osteoinduttiva [27]. Al contrario, le bioceramiche mostrano una buona osteoconduttività, un'elevata resistenza alla compressione e una buona integrazione ossea. Il fosfato di calcio più comune è l'idrossiapatite (HA), che ha una struttura cristallina ed è il principale materiale inorganico che compone la maggior parte delle ossa umane. L'idrossiapatite può essere ottenuta da fonti naturali o può essere sintetizzata [27,29,36]. Un altro materiale utilizzato negli scaffold ossei è il biovetro, un materiale composto da calcio, fosfato e silicio. Questo materiale è noto per essere biocompatibile e osteoinduttivo poiché facilita la migrazione e la differenziazione cellulare potenziate. Inoltre, esso si integra con il tessuto osseo nativo producendo uno strato di fosfato di calcio che può formare un legame chimico con l'osso nativo. È stato dimostrato che gli scaffold porosi 3D in chitosano/biovetro hanno mostrato una buona biocompatibilità e alti tassi di proliferazione cellulare [36]. Anche i materiali metallici vengono utilizzati nell'ingegneria dei tessuti grazie alla loro elevata resistenza meccanica e grazie alla loro tenacità alla frattura. Questi materiali vengono utilizzati in odontoiatria e ortopedia come sostituzione o supporto. L'acciaio inossidabile è il metallo più utilizzato. Sono molto utilizzate anche le leghe a base di Cobalto (principalmente ASTM F75 e ASTM F799) e le leghe a base di titanio (principalmente

Ti6Al4V) [30]. Di recente si è iniziato a parlare di leghe di magnesio come una nuova classe promettente di biomateriali degradabili che ha una rigidità simile all'osso e che riduce al minimo gli effetti dannosi della protezione dallo stress [37]. Inoltre, con un approccio combinatorio è possibile ottenere scaffold con grandi proprietà. Diversi compositi sono ampiamente studiati nell'ingegneria del tessuto osseo. Combinare polimeri e ceramici in un unico scaffold aiuta a mantenere l'interazione con la meccanica e la fisiologia del tessuto ospite. I composti meta-ceramici sono una classe di ibridi che hanno mostrato una maggiore integrità meccanica e migliori proprietà osteogeniche, rispetto al solo scaffold metallico [30].

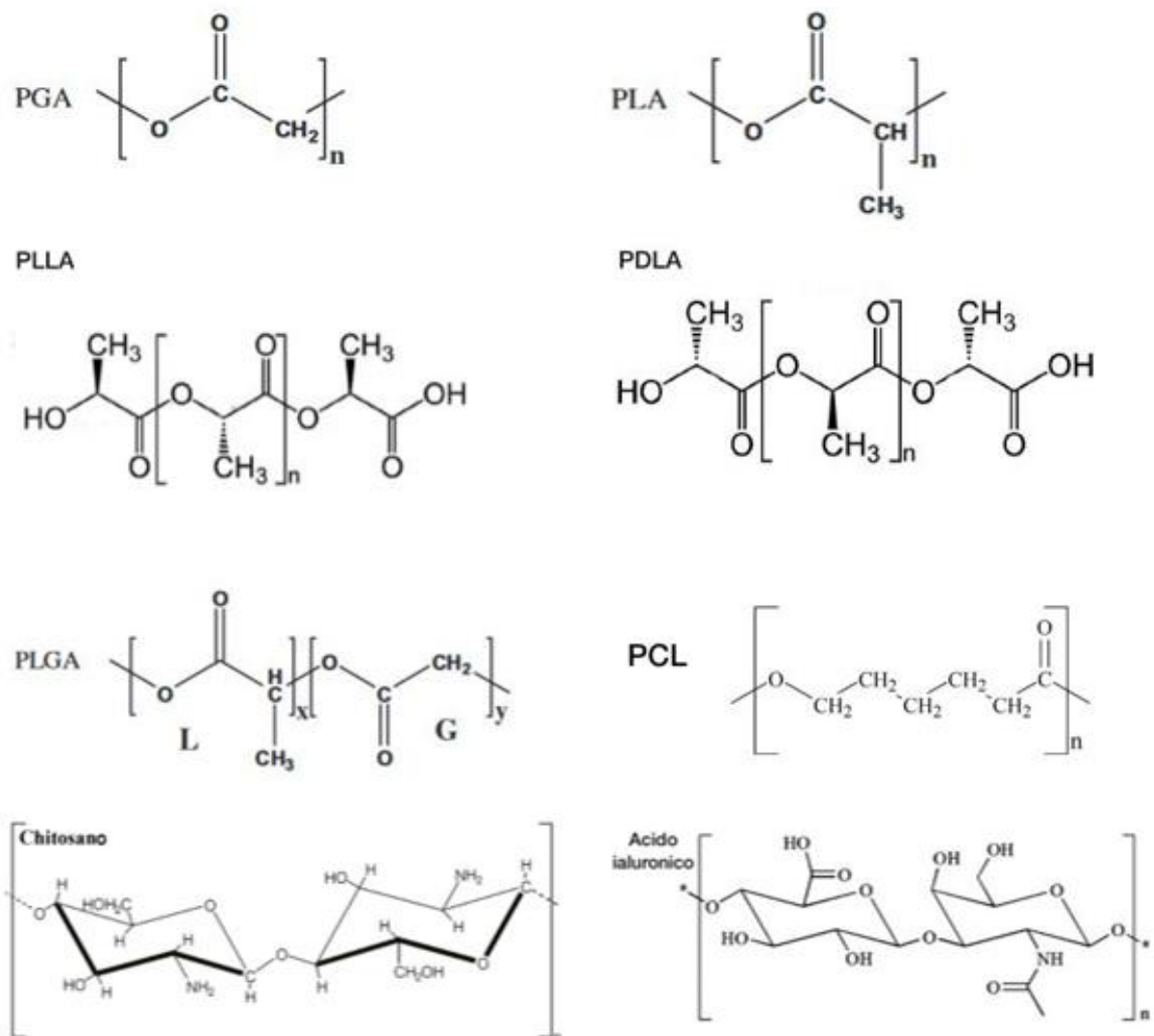


Figura 4: Struttura chimica dei polimeri PGA [38], PLA [38], PLLA [39], PDLA [39], PLGA [38], e PCL [40], del chitosano [41] e dell'acido ialuronico [42].

Tabella 2: Tabella riassuntiva dei biomateriali per la produzione di scaffold 3D insieme ai loro metodi comuni di applicazione, vantaggi e svantaggi. Adattata da [44].

<b>Materiali</b>	<b>Esempi</b>	<b>Applicazioni</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b>Ceramiche</b>	HA (idrossi-apatite); β-TCP (beta tri-calcio fosfato); α-TCP (alfa tri-calcio fosfato); ZrO <sub>2</sub> (ossido di zirconio); TiO <sub>2</sub> (biossido di titanio); Biovetri porosi; Silicato di calcio; Solfato di calcio.	Sostituzione dei tessuti duri; Applicazione ortodontica.	Buona biocompatibilità e bioattività [43].	Bassa tenacità e resistenza insufficiente [43].
<b>Polimeri naturali</b>	Proteine : seta, collagene, gelatina, fibrinogeno, actina, cheratina.  Polisaccaridi: alginato, chitosano, cellulosa, destrano, chitina, glicosaminoglicano, acido ialuronico, agarosio.  Polinucleotidi: DNA (acido desossiribonucleico); RNA (acido ribonucleico).	Applicazione del tessuto duro e connettivo; Tessuti/organi viventi decellularizzati Tessuti duri e molli sui candidati.  Terapia genetica	Eccellenti proprietà biodegradabili e biocompatibili [29].	Proprietà meccaniche scarse che limitano le loro applicazioni in siti anatomici con carichi meccanici impegnativi come la rigenerazione dei tessuti duri [29].
<b>Polimeri sintetici</b>	Degradabili: poliesteri, poliortoesteri, polilattone, policarbonati, polianidridi, polifosfazi.  Non degradabili: PE (polietilene), PTFE (politetrafluoroetilene), PMA (polimetilacrilato), PAA (acido poliacrilico), PU (poliuretano), polietere, polisilossani.	Sistemi di somministrazione e di farmaci; Impianti.  Impianti ortopedici	No, problemi immunologici [29]; Maggiore grado di flessibilità di elaborazione [29].	Ridotta capacità di combinarsi con frazioni bioattive per rafforzare la loro affinità cellulare [29].
<b>Metalli e leghe</b>	Lega Co–Cr (lega di cobalto e cromo); Ti (titanio); Lega Ti–6Al–4V (lega di titanio); Acciaio inossidabile; Lega Mg–Ca (lega di magnesio).	Applicazione ortopedica e odontoiatrica; Udito artificiale.	Buona tenacità e lavorabilità [43].	Corrosione [43].
<b>Compositi</b>	Miscele di polimeri e ceramiche/metalli	Applicazioni ortopediche e odontoiatriche.	Buone prestazioni meccaniche e biologiche.	Il non preciso contatto tra biomateriali non omogenei può causare propagazione di cricche.



## *1.7 Tecniche di realizzazione di scaffold*

È necessario realizzare scaffold con dimensioni appropriate e dimensioni dei pori specifiche. La dimensione dei pori non solo regola la vascolarizzazione ma anche la deposizione di matrice extracellulare, le proprietà meccaniche, l'organizzazione, la filtrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Oltre alla dimensione dei pori anche la resistenza meccanica, il tasso di degradazione e la topografia devono corrispondere a quelli del tessuto ospite per un'efficace guarigione e rigenerazione ossea [30]. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi processi di fabbricazione di scaffold. Tra i diversi metodi abbiamo il processo di schiumatura del gas che genera una schiuma polimerica altamente porosa utilizzando azoto o anidride carbonica, la separazione di fase indotta termicamente (TIPS), che è un metodo di fabbricazione basato sulla soppressione della fase liquido-liquido e solido-liquido, attraverso la transizione di temperatura, la colata con solvente e metodo di lisciviazione del particolato, una procedura semplice ed economica in cui particelle solide uniformemente disperse vengono miscelate con una soluzione polimerica e, infine, la sinterizzazione di microsferi con cui vengono realizzati scaffold sinterizzando microsferi ibride polimero/ceramica e utilizzando la tecnica dell'evaporazione del solvente. Generalmente, tramite questi processi vengono formati fogli o blocchi di materiale che poi devono essere ulteriormente trattati attraverso macchine a controllo numerico o altri dispositivi. Parallelamente si sono sviluppati i processi di filatura, ovvero tecniche utilizzate per produrre nanofibre polimeriche attraverso un processo di estrusione specializzato in presenza di forze motrici esterne. Sono stati proposti molti metodi di filatura come, ad esempio, l'elettrofilatura e le sue varianti [30]. Grazie agli enormi progressi, anche la stampa tridimensionale (3D) è diventata un metodo di fabbricazione enormemente utilizzato nel campo dell'ingegneria tissutale [30]. La stampa 3D è un metodo di lavorazione dei materiali basato su modelli CAD (computer aided design) tridimensionali, ovvero modelli progettati a computer [45]. Questi modelli per essere stampati vengono salvati nel formato STL (Standard Triangulation Language To Layer), il quale approssima le superfici di un modello solido con dei triangoli. Questa stampa è in grado di fabbricare componenti fisici funzionali con o senza porosità depositando i materiali strato per strato. La produzione di strutture avanzate attraverso la stampa 3D è facilitata grazie alla possibilità di apportare modifiche direttamente sul modello CAD della struttura stessa [46]. Le tecnologie di stampa 3D per la realizzazione di scaffold di tessuto osseo includono un'ampia gamma di approcci e utilizzano diversi tipi di materiali inclusi metalli, polimeri, ceramiche o persino cellule che vengono incapsulate all'interno di un bio-inchiostro [46].

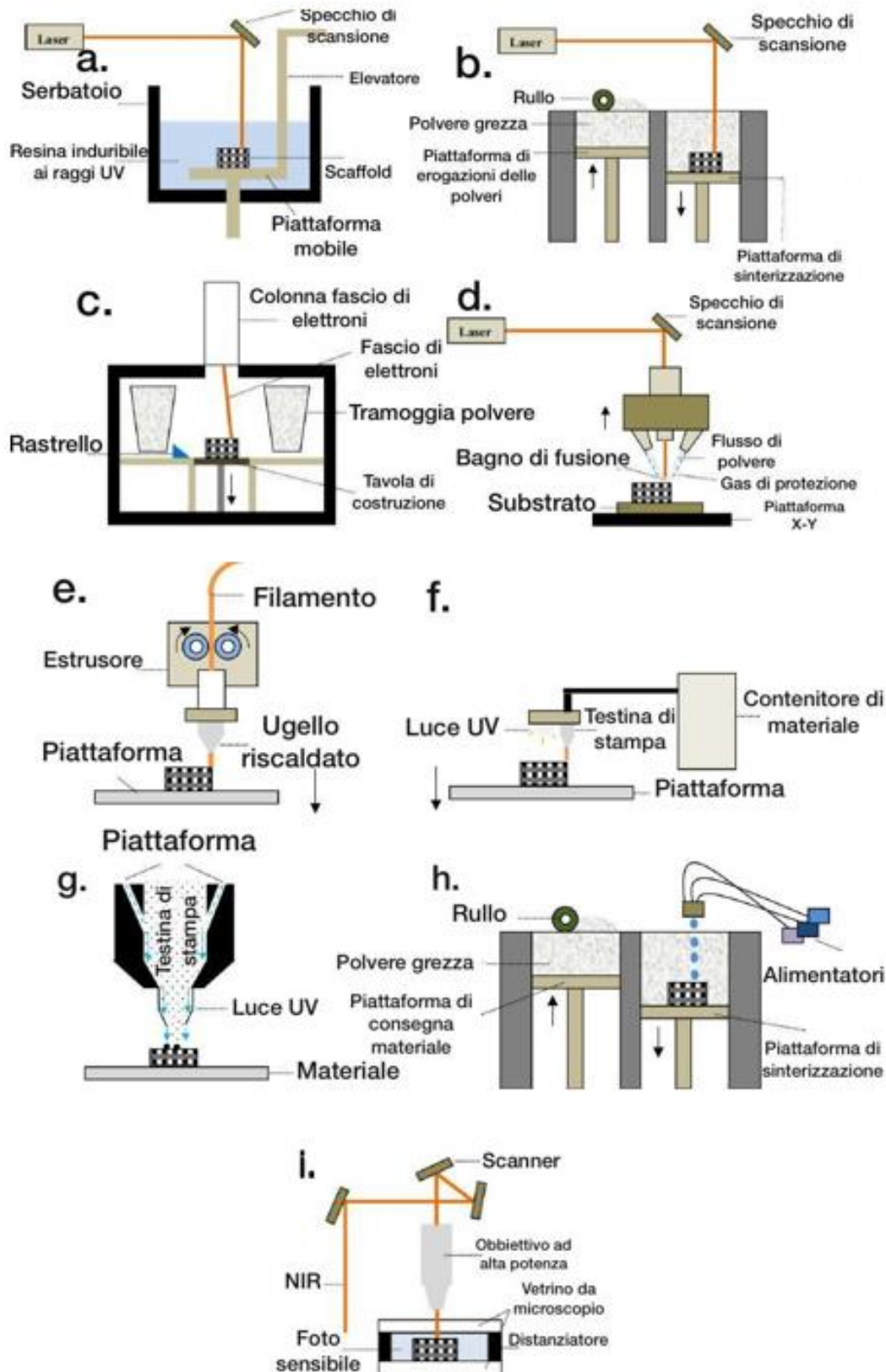


Figura 5: (a) Stereolitografia (SLA); (b) Sinterizzazione laser selettiva (SLS) / Fusione laser selettiva (SLM) (può rappresentare entrambe poiché la differenza sta solo nei materiali usati); (c) Fusione del fascio di elettroni (EBM); (d) Sagomatura con tecnologia laser (LENS); (e) Modellazione a deposizione fusa (FDM); (f) Getto di materiale (MJ); (g) Stampa a getto di aerosol (AJP); (h) Stampa a getto d'inchiostro (IJP); (i) Polimerizzazione a due fotoni (2PP). Adattata da [46].

Di seguito sono descritte le tecnologie che utilizzano materiali polimerici. La modellazione a deposizione fusa (FDM, Figura 5.e) estrude un materiale, che è tipicamente un polimero termoplastico, attraverso un ugello mobile su una piattaforma di costruzione. Il movimento dell'ugello è nelle direzioni X e Y facendo sì che il filamento venga depositato sulla piattaforma e costruisca una serie parallela di depositi di materiale per fornire infine il primo strato del componente. Successivamente, la piattaforma si sposta verso il basso lungo l'asse Z per la fabbricazione del successivo nuovo strato sullo strato precedente. Quando il materiale depositato si raffredda, si solidifica e aderisce allo strato precedente. La tecnica di getto di materiale (MJ, Figure 5.f) estrude un fotopolimero liquido (il materiale viene prima riscaldato per ottenere la viscosità ideale per la stampa) attraverso una testina di stampa che si sposta su una piattaforma per depositare un certo numero di goccioline di polimero, e utilizza la luce UV per solidificare gli strati quando si accumulano. Quando lo strato è completato, la piattaforma si abbassa di uno spessore dello strato e il processo viene ripetuto fino a quando non viene costruita l'intera parte. Nella stereolitografia (SLA, Figura 5.a) il materiale fotosensibile (resina) viene convertito in solido in una piattaforma quando viene esposto a una sorgente di luce ultravioletta (UV) e dal movimento del raggio UV basato sulla prima fetta del modello, si forma uno strato. Per costruire lo strato successivo, la piattaforma viene spostata verso il basso e la resina liquida fresca scorre sul primo strato, viene solidificata e aderisce allo strato precedente. Nella sinterizzazione laser selettiva (SLS, Figura 5.b) il materiale utilizzato è sotto forma di polvere polimerica che viene prima posizionata su una piattaforma. Successivamente un laser la sinterizza selettivamente aumentando la temperatura poi la piattaforma di stampa viene successivamente abbassata e un rullo sparge un nuovo strato di polvere sulla superficie di lavoro precedente. Nella polimerizzazione a due fotoni (2PP, Figure 5.i) un laser a impulsi nel vicino infrarosso (NIR) viene concentrato in un volume di soluzione fotosensibile per causare un cambiamento di fase da liquido a solido mediante un processo di polimerizzazione per fabbricare strutture 3D [46].

Altre tecnologie utilizzano materiali metallici o inchiostri. Nella fusione del fascio di elettroni (EBM, Figura 5.c) gli elettroni accelerati generati riscaldando un filamento di tungsteno vengono utilizzati per integrare la materia in base al modello CAD fornito scansionando le polveri metalliche in una camera a vuoto per sinterizzarle. La piattaforma di costruzione si abbassa dopo la costruzione di ogni strato del componente prescritto, consecutivamente [46]. Nella sagomatura con tecnologia laser (LENS, Figura 5.d) si utilizzano polveri metalliche o ceramiche che vengono distribuite su un tavolo a controllo numerico nel piano XY. Un raggio laser viene quindi diretto sulla polvere per fornire sezioni trasversali del modello. Il tavolo si sposta nelle direzioni X e Y secondo il modello del computer. Dopo aver costruito uno strato, la testa laser e l'ugello di alimentazione della polvere si spostano verso l'alto di una distanza basata sullo spessore dello strato da generare. La fusione laser selettiva (SLM, Figura 5.b)

funziona in modo simile a SLS, tuttavia, utilizza un raggio laser per fondere polvere di metallo anziché polvere di polimero. Simile a EBM, la costruzione di oggetti in SLM è condotta in una camera di atmosfera altamente controllata di gas inerte. Uno strato di polvere metallica, infatti, viene distribuito uniformemente su una piastra metallica di supporto fissata ad un tavolo con movimento verticale. Ogni strato viene fuso selettivamente mentre il raggio laser esegue la scansione nelle direzioni X e Y. Si basa sul simultaneo assorbimento di due fotoni che inducono reazioni chimiche [46]. La stampa a getto di aerosol (AJP, Figure 5.g) utilizza la messa a fuoco aerodinamica per erogare un inchiostro da stampa su un substrato che può essere pianificatore o non pianificatore poiché ha la capacità di stampare a distanze variabili. Infine, la stampa a getto d'inchiostro (IJP, Figure 5.h) è una tecnica di stampa goccia a goccia che può, eventualmente, creare strutture cellularizzate. La testina di stampa si trova su un letto di polvere e distribuisce l'inchiostro sulla polvere attraverso una routine programmata per fornire una forma particolare relativa alla prima sezione. La distanza della testina di stampa e della piattaforma viene quindi aumentata per far rotolare un nuovo strato di polvere sul palco per la scansione della sezione trasversale successiva che aderisce allo strato precedentemente stampato. Questo processo viene ripetuto fino a raggiungere l'intero oggetto fisico [46].

Tabella 3: Descrizione sintetica delle tecnologie di stampa 3D. Adattato da [46].

<b>Categoria</b>	<b>Nome</b>	<b>Materiali compatibili</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Limiti</b>
<b>Laser</b>	SLA (Stereolithography)	Fotopolimeri liquidi	Adatto per strutture con caratteristiche interne complesse e di grandi dimensioni; Biostampa; Buona precisione; Alta risoluzione.	Si strutture di supporto; Difficile rimozione delle strutture di supporto.
	SLS (Selective laser sintering)	Polveri polimeriche e ceramiche	No post-processing; No strutture di supporto; Buone proprietà meccaniche; Economico.	Spreco di materiale; Difficile rimozione della polvere intrappolata.
	EBM (Electron beam melting)	Polveri metalliche	Buone proprietà meccaniche.	Lento e costoso; Necessità di strutture di supporto.
	LENS (Laser engineered net shaping)	Polveri ceramiche e metalliche	Buone proprietà meccaniche; Capacità di fabbricare compositi.	Si post-processing; Rimozione supporti; Bassa precisione dimensionale.
	SLM (Selective laser melting)		Buone proprietà meccaniche	Probabilità di deformazione; Proprietà meccaniche inconsistenti; Lento e costoso.
	2PP (Two-photon polymerization)	Fotopolimero o soluzioni di idrogel	Buona risoluzione; Funzionalità di dimensioni nanometriche.	Utilizzato insieme ad altri metodi per fornire proprietà dei materiali favorevoli.
<b>Estrusione</b>	FDM (Fused deposition modeling)	Filamenti compositi polimerici e a base di polimeri	Buone proprietà meccaniche; Velocità moderata per controllare porosità; Adattabile per bioprinting.	Non adatto alla stampa della maggior parte delle proteine e delle cellule causa il riscaldamento necessario per fornire la fase fusa.
	MJ (Material jetting)	Fotopolimeri liquidi	Non necessita di post polimerizzazione	Scarse proprietà meccaniche.
<b>Inchiostro</b>	IJP (Inkjet printing)	Idrogel, polimeri e ceramiche come policaprolattone, idrossiapatite, vetri bioattivi e acido polilattico.	Biostampa; Veloce ed economico.	Costrutti spesso fragili Si post-processing.
	AJP (Aerosol jet printing)	Nanoparticelle metalliche, come l'argento, possono essere incorporate	Risoluzione superiore rispetto a IJP; Gamma di materiali con viscosità inferiori rispetto a IJP.	Non adatto al bioprinting; Caro.

Come accennato sopra, ultimamente si è iniziato a parlare di leghe di magnesio. Tuttavia, le leghe di magnesio sono difficili da stampare in 3D a causa dell'elevata reattività chimica che rappresenta un rischio di combustione. Un metodo utilizzato è SLM con parametri, come potenza laser, velocità di scansione e spessore dello strato, ben definiti e adatti alle caratteristiche del magnesio. Un modo per determinare i parametri significativi in questa metodica di fabbricazione è utilizzare un metodo statistico che aiuta a ridurre i costi e il tempo necessari per trovare i parametri significativi riducendo il numero di esperimenti. SLM è quindi il metodo più studiato per la stampa di leghe di magnesio a causa del flusso di calore relativamente piccolo e delle complesse geometrie interne ed esterne consentite da questa tecnologia [37].

### *1.8 Geometrie degli scaffold ossei*

Per la rigenerazione di tessuti ossei gli scaffold devono possedere diverse caratteristiche strutturali difficili da ottenere. Tali caratteristiche sono necessarie per massimizzare la diffusione dei nutrienti e il flusso sanguigno, per controllare la crescita e la funzione cellulare e per ottimizzare la funzione meccanica dello scaffold e le proprietà meccaniche del tessuto rigenerato [47]. Ultimamente sono stati tanti gli studi effettuati sulla struttura e porosità dello scaffold adatte nella rigenerazione ossea per ottimizzare al meglio i requisiti sopra elencati. Le strutture porose possono essere descritte dal punto di vista del design cellulare e dal punto di vista dell'intero design. Il design cellulare è stato suddiviso in design parametrico e non parametrico. Il design cellulare non parametrico è un design strutturale e geometrico di cui fanno parte il cubo semplice, il diamante/cubo a facce centrate (FCC), il cubo a corpo centrato (BCC)/ottaedro e le altre strutture poliedriche come il dodecaedro rombico (RD), il traliccio a otteetto e il cubo troncato che sono le strutture più utilizzate nel campo degli scaffold ossei. Il design cellulare parametrico si genera secondo algoritmi specifici. Esistono due metodi principali per progettare la struttura porosa secondo algoritmi, la modellazione attraverso le superfici minime periodiche (TPMS) e la tassellatura di Voronoi. Inoltre, siccome la porosità dell'impalcatura cambia, l'intero design dello scaffold è stato suddiviso in design uniforme, in cui la porosità dell'intero scaffold è la stessa, design a gradiente a strati, in cui la porosità varia nei diversi strati e design a gradiente continuo, in cui la porosità cambia in maniera continua [48]. Recentemente sono stati progettati scaffold porosi per imitare da vicino la struttura naturale dell'osso trabecolare grazie alla tassellatura Voronoi selettiva con semina preferenziale. Per questo motivo è stato introdotto un flusso di lavoro per generare queste strutture [49]. Una tassellatura di Voronoi è generata come mostrato in Figura 6.

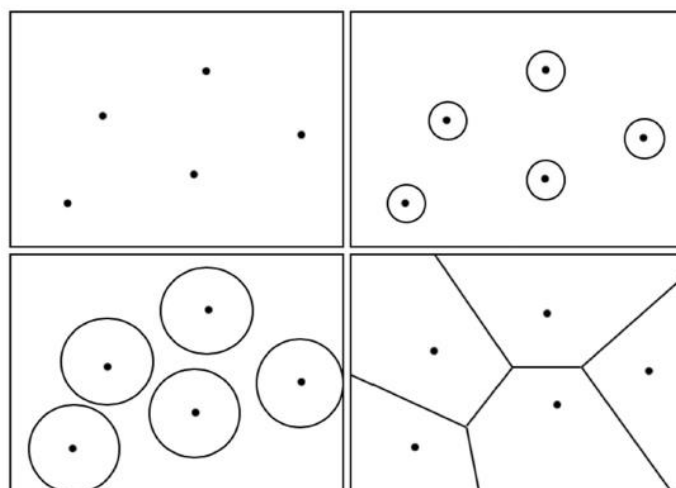


Figura 6: Rappresentazione grafica che mostra la formazione di un diagramma di Voronoi in 2D. I semi sono distribuiti casualmente in una regione, crescono verso l'esterno fino a quando non si scontrano l'uno con l'altro e formano poligoni distinti. Adattata da [49,50].

Questo metodo ci consente di regolare il modulo elastico apparente, ovvero il modulo elastico che calcoliamo deflettendo il provino oltre il suo limite di proporzionalità e che di conseguenza non può rappresentare il vero modulo di elasticità all'interno del limite elastico del materiale, di diverse parti dello scaffold controllando il cambiamento del gradiente strutturale [51]. Per generare una tassellatura di questo genere, in primo luogo, i semi vengono posti in uno spazio finito da cui un poligono o poliedro cresce verso l'esterno, espandendosi a una velocità costante per riempire uno spazio. La crescita termina quando i poliedri vicini si scontrano l'uno con l'altro. In uno spazio tridimensionale, questi confini sono costituiti da piani piuttosto che linee [49]. Così vengono generate piccole strutture poliedriche irregolari nello spazio di progettazione. I bordi comuni dei poliedri sono usati come generatrici della struttura. In questo modo, nello spazio progettuale possono essere generate strutture a trave complesse e irregolari. Queste strutture vengono utilizzate per simulare la struttura trabecolare irregolare dell'osso naturale [51]. La tassellatura selettiva di Voronoi è un metodo efficace per generare scaffold porosi biomimetici con maggiore anisotropia e architettura del montante sintonizzabile in tre dimensioni come alternativa adatta alle geometrie ossee derivate dal paziente [49]. Il controllo dei punti di semina è fondamentale per il successo della modellazione di scaffold irregolari porosi [52]. Le indagini per valutare l'efficacia della struttura di Voronoi come impalcatura ossea vengono comunemente avviate con la progettazione della struttura utilizzando un software appropriato, seguita dalla sua fabbricazione e quindi da una valutazione nell'ambito della morfologia, delle proprietà meccaniche e fluidiche e della biocompatibilità [53]. Una suite di software: Rhinoceros & Grasshopper (Robert McNeel & Associates, Seattle, USA), Libreria Voro++ (una libreria di software open source), nTopology (nTopology, New York, USA) e script MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA), sono stati utilizzati per implementare la struttura

di Voronoi. Il primo software citato ha una netta precedenza [53]. Rhinoceros3D 6 con il componente aggiuntivo di programmazione grafica Grasshopper è stato utilizzato per modellare strutture semplici mediante la tassellatura di Voronoi [49]. Nell'ambiente software Grasshopper, sono stati progettati una serie di metodi per controllare la distribuzione di punti casuali poiché tale distribuzione, a sua volta, controlla la distribuzione della densità numerica delle celle di Voronoi. Grazie al metodo dell'operazione booleana viene generata una struttura simile all'osso trabecolare. Il metodo per ottenere un'impalcatura porosa con tassellatura di Voronoi può essere semplicemente suddiviso in più passi spiegati alla Figura 7 [51].

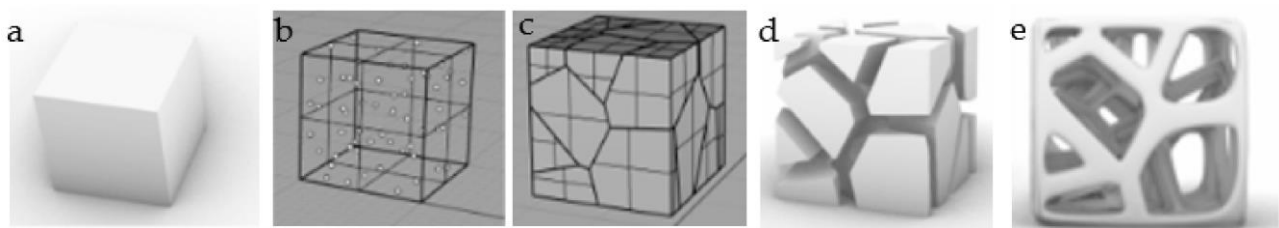


Figura 7: Passaggio 1, assumere il cuboide come spazio di progettazione; Passaggio 2, generare casualmente  $n$  punti discreti nel cuboide; Passaggio 3, prendere i punti discreti come nucleo per generare poliedri Voronoi con bordi comuni; Passaggio 4, ottenere la struttura del montante tramite l'operazione booleana. Adattato da [51].

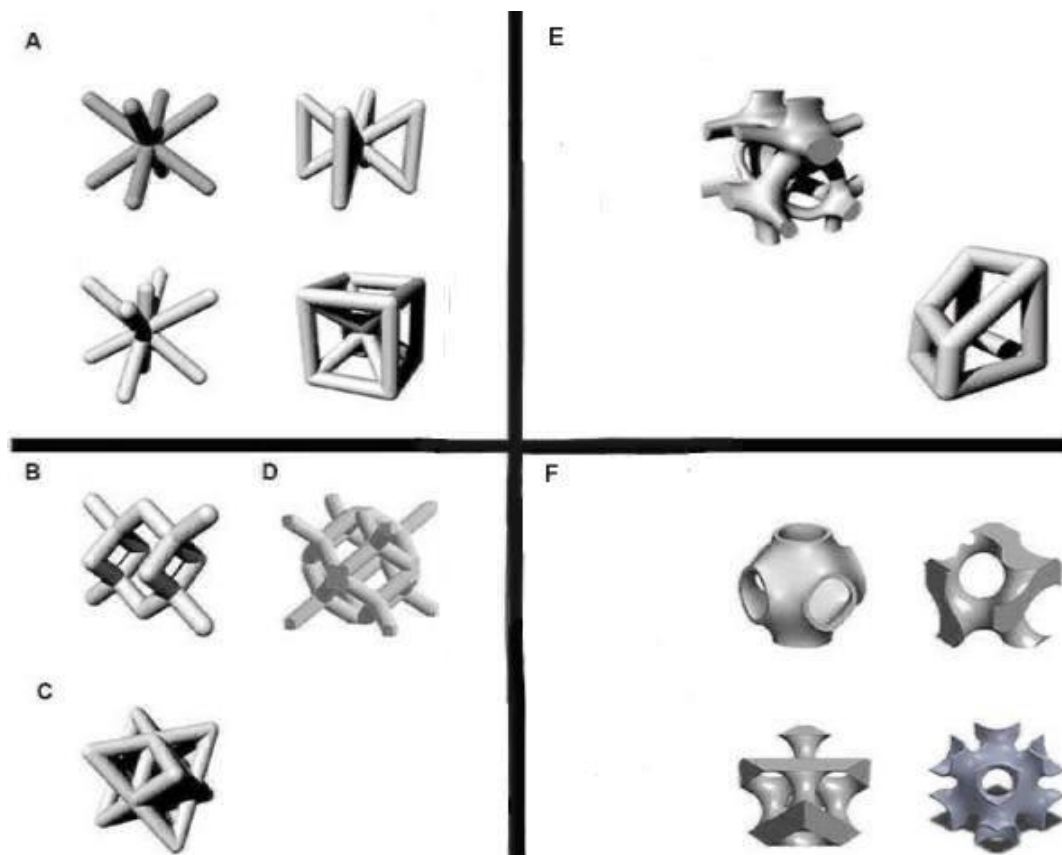


Figura 8: Unità di vari design non parametrici e parametrici. (A) Cubica a corpo centrato (BBC) e le sue varianti. (B) Diamante. (C) Ottaedro. (D) Dodecaedro rombico. (E) Unità Voronoi. (F) Unità TPMS. Adattata da [48].



## **2. SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di investigare lo stato dell'arte delle principali strategie di produzione di scaffold ossei ottenuti attraverso le tecnologie additive. In particolare, dopo un'accurata analisi della letteratura delle principali tecnologie per ottenere scaffold ossei stampati in 3D, sono state classificate e analizzate le principali geometrie. Di ogni struttura vengono valutati vantaggi e svantaggi in termini di produzione, morfologia e prestazioni meccaniche. Nello specifico, si vuole arrivare alle più recenti modellazioni, tra cui la tassellatura di Voronoi, e si vuole proporre i possibili sviluppi futuri di tali strutture nel campo della rigenerazione ossea e gli studi futuri riguardanti le loro proprietà e caratteristiche non ancora note.

## **3. METODI DELLA RICERCA**

Per svolgere questo elaborato ho effettuato una ricerca accurata di articoli scientifici riguardanti gli scaffold ossei utilizzando i database di PubMed e Google Scholar (dal 1990 al 2022) soffermandomi su articoli e review pubblicati sulle principali riviste del settore (impact factor tra 2 e 15). Inoltre, per raffinare ulteriormente la ricerca, ho visionato la lista di citazioni di ogni articolo. Per ricercare i vari argomenti ho utilizzato diverse parole chiave per le diverse sezioni:

- Per la sezione di “INTRODUZIONE” le principali parole chiave ricercate sono: bone-structure, mechanical-bone-properties, bone-stiffness, bone-cells, bone-remodeling, cortical-and-trabecular-bone, rigenerative-medicine, bone-graft, bone-scaffold, bone-plates-screws, bone-scaffold-additive-manufacturing, bone-scaffold-biomaterials.
- Per la sezione “RISULTATI E DISCUSSIONI” le principali parole chiave ricercate sono: cube-lattice-bone-scaffold, FCC-lattice-bone-scaffold, diamond-lattice-bone-scaffold, BCC-lattice-bone-scaffold, rhombic-dodecahedron-lattice-bone-scaffold, cube-truncated-lattice-bone-scaffold, octahedron-lattice-bone-scaffold, octet-truss-lattice-bone-scaffold, bone-scaffold-porosity, bone-scaffold-Voronoi-tassellation.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 Geometria cubica semplice

Il cubo semplice è la struttura meno complessa con cui produrre la tela interna dello scaffold. Nel corso degli anni, sono state realizzate numerose ricerche riguardanti questo tipo di struttura. Studi realizzati da Temple et al. riguardano la tessitura interna a reticolo cubico semplice di scaffold per il trattamento di grandi difetti ossei cranio-maxillo-facciali. Vengono sagomati scaffold in policaprolattone (PCL) con porosità interne rettangolari variabili. Tali strutture sono state realizzate attraverso la stampa 3D basata sull'estrusione e hanno mantenuto lo stesso livello di porosità, consentendo la semina cellulare e la vascolarizzazione [54].

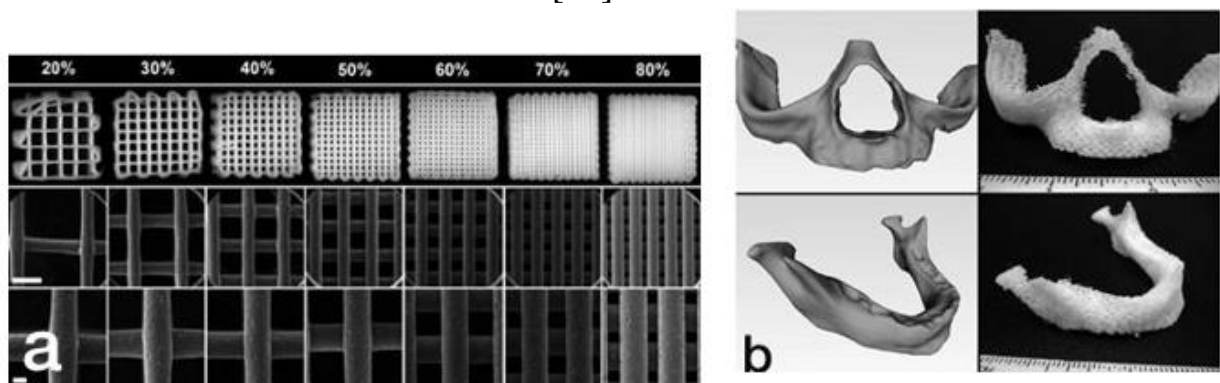
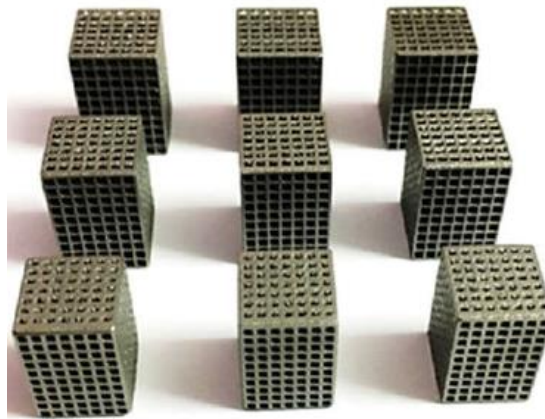


Figura 9: (a) Microscopia elettronica a scansione. (Riga superiore) immagini stereomicroscopiche di scaffold 15x15x5 mm con densità di riempimento che vanno dal 20 all'80%. (Riga centrale) Le immagini SEM scattate con ingrandimento 25X dimostrano l'uniformità dei pori e le larghezze delle fibre. Scale bar = 1 mm. (Riga inferiore) Le immagini SEM con ingrandimento 55X illustrano le superfici delle fibre. Scale bar = 200  $\mu$ m. (b) Scaffold di forma anatomica. A sinistra: geometrie 3D isolate della mascella (in alto) e della mandibola (in basso). A destra: scaffold PCL porosi stampati in 3D con una densità di riempimento del 40%. Adattato da[54].

Siccome sono stati testati scaffold con diverse densità di riempimento si è dimostrato che a densità inferiori (20% e 30%) gli aggregati cellulari più grandi si sono depositati sul fondo degli scaffold, mentre al 50% gli aggregati più grandi non sono penetrati adeguatamente nello scaffold. La semina più uniforme è stata ottenuta utilizzando gli scaffold con una densità di riempimento del 40%. A questa particolare densità di riempimento, con una dimensione dei pori di circa 800  $\mu$ m, gli aggregati cellulari sono stati dispersi uniformemente attraverso i pori dell'impalcatura. Per dimensioni dei pori maggiori di 800  $\mu$ m, gli aggregati tendevano a depositarsi sul fondo degli scaffold e per dimensioni dei pori inferiori, gli aggregati grandi ostruivano i pori, impedendo la dispersione uniforme delle cellule [54]. Uno svantaggio della struttura reticolare cubica semplice sta nel fatto che in diversi studi è stato notato che in strutture prodotte attraverso la stampa 3D i montanti orizzontali hanno molte più porosità rispetto ai montanti diagonali: nelle strutture cubiche non ci sono travi inclinate e 2/3 di esse sono orizzontali (mentre 1/3 di essi sono verticali), quindi una grande percentuale di

montanti presenta diverse porosità interne che diminuiscono le proprietà elastiche sperimentali rispetto alle proprietà che ci si aspettavano teoricamente [55–57]. Per migliorare le prestazioni meccaniche Dhiman et al. hanno realizzato scaffolds in lega Ti6Al4V (Ti64) attraverso SLA. Tale lega è emersa essere un biomateriale metallico di successo grazie alle sue caratteristiche, tra cui un'eccellente resistenza meccanica e una biocompatibilità superiore. Analizzando le proprietà meccaniche del costruito si è scoperto che la massima resistenza alla compressione finale è risultata essere 119 Mpa con una dimensione dei pori di 600  $\mu\text{m}$  e una densità relativa complessiva del 55%, che è paragonabile a quella dell'osso umano [58].



*Figura 10: Strutture reticolari cubiche porose fabbricate mediante la fusione laser selettiva. Adattato da [58].*

Gao et al. hanno progettato e fabbricato mediante SLM scaffold porosi di tantalio (Ta), un metallo inerte con eccellenti proprietà biologiche. Tali scaffold sono composti da celle unitarie a reticolo cubico ottimizzate con porosità del 65%, 75% e 85% e mostrano un comportamento duttile alla deformazione e un'eccellente affidabilità meccanica. La gamma ottimale di dimensioni dei pori degli impianti, favorevole alla crescita interna di nuovo osso e vasi sanguigni, secondo questo studio, è risultata essere 300-800  $\mu\text{m}$ . Il modulo elastico degli scaffold a reticolo cubico in Ta con porosità del 65%, 75% e 85% è rispettivamente di  $1.5\pm 0.6$ ,  $1.1\pm 0.3$  e  $0.7\pm 0.2$  GPa e il carico di snervamento è rispettivamente di  $40.5\pm 0.8$ ,  $28.1\pm 0.3$  e  $17.6\pm 0.5$  MPa. L'elevata resistenza allo snervamento e il modulo elastico relativamente basso paragonabile all'osso circostante sono favorevoli per la stabilità a lungo termine degli impianti, specialmente nelle aree portanti [59].

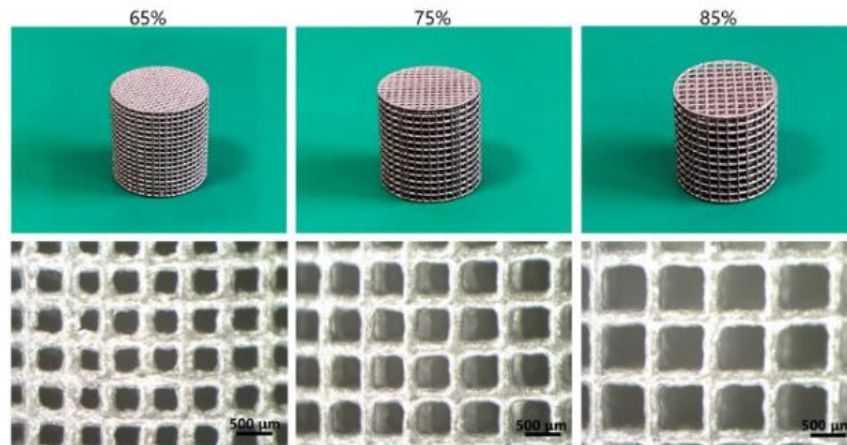


Figura 11: Fotografie macroscopiche e micrografie ottiche che mostrano la struttura porosa di scaffold a reticolo cubico di tantalio con porosità del 65%, 75% e 85%. Adattata da [59].

Una grande deformazione in queste impalcature però provoca la frattura del montante con micropropagazione della cricca e la maggior parte dei siti di fratturazione si trova su puntoni verticali. In generale, rispetto alle strutture casuali, le strutture reticolari periodiche hanno un'interconnettività superiore e le loro microarchitetture e proprietà meccaniche sono più facili da controllare regolando le caratteristiche morfologiche di una singola cella unitaria [59]. Anche nello studio di Lu et al. sono stati realizzati scaffold con reticolo cubico in tantalio. In questo lavoro sono stati effettuati esperimenti biologici su 24 conigli neozelandesi adulti sani (12 maschi e 12 femmine), di età compresa tra 2 e 3 mesi e peso di 2.0–2.3 kg (in media 2.2 kg). Ogni coniglio è stato sottoposto a discectomia, ovvero la rimozione del disco intervertebrale, a 3 livelli: L3–L4, L4–L5 e L5–L6. A ogni livello è stata assegnata in modo casuale una delle 3 procedure: (1) solo discectomia (gruppo di controllo); (2) discectomia con osso autologo impiantato; e (3) discectomia con tantalio poroso impiantato. Tutti i 24 conigli sono stati sacrificati casualmente in tempi diversi: 2 mesi (n = 6), 4 mesi (n = 6), 6 mesi (n = 6) e 12 mesi (n = 6) [60].



Figura 12: Gli impianti cubici di tantalio poroso (lunghezza, larghezza e altezza di circa 2.5 – 3.0 mm). Adattato da [60].

Le condizioni di guarigione delle ferite e i movimenti delle gambe posteriori sono stati osservati da vicino dopo l'intervento chirurgico. Le valutazioni neurologiche sono state

condotte a 1 settimana dopo l'intervento e prima dell'eutanasia (2, 4, 6 e 12 mesi dopo l'intervento). Le radiografie della colonna lombare sono state eseguite immediatamente dopo l'intervento chirurgico per determinare la posizione degli impianti al tantalio e degli innesti ossei. Tutti i conigli sono sopravvissuti e hanno recuperato le attività di camminata gradualmente dopo l'operazione, senza alcun sintomo di lesione nervosa. A 2, 4, 6 e 12 mesi dopo l'intervento, 6 conigli, rispettivamente, sono stati selezionati casualmente per sacrificare e ottenere i campioni lombari che sono stati impostati per l'esame di tomografia microcomputerizzata. È stato possibile notare che il tantalio poroso, avendo una struttura completamente aperta, è benefico per la crescita ossea nell'impianto. Il modulo Young dello scaffold di tantalio è stato calcolato a 0.6 GPa, un valore simile ma leggermente superiore a quello delle ossa umane. Inoltre, questo studio ha valutato la tossicità cellulare e la biocompatibilità dell'impianto di tantalio in una cultura di cellule staminali mesenchimali dell'osso in vitro. L'attaccamento e la proliferazione di tali cellule staminali mesenchimali nella pianta porosa di tantalio sono stati osservati dopo sette giorni di coltura. I risultati hanno mostrato che gli impianti al tantalio sono atossici e hanno una buona biocompatibilità. Di fatti nessuna risposta infiammatoria locale significativa è stata trovata intorno o nei materiali dell'impianto in tantalio. Risultati simili sono stati ottenuti con innesti ossei autologhi, che hanno confermato che scaffold a reticolo cubico di tantalio potrebbero essere usati come efficaci sostituti ossei [60]. Nello studio proposto da Sabree et al. è stato realizzato uno scaffold in ceramica altamente poroso con geometria interna cubica semplice. Attraverso SLA sono stati fabbricati stampi polimerici che definiscono l'architettura interna dell'impalcatura, che è stata realizzata in seguito attraverso il processo di colata di gel [14].

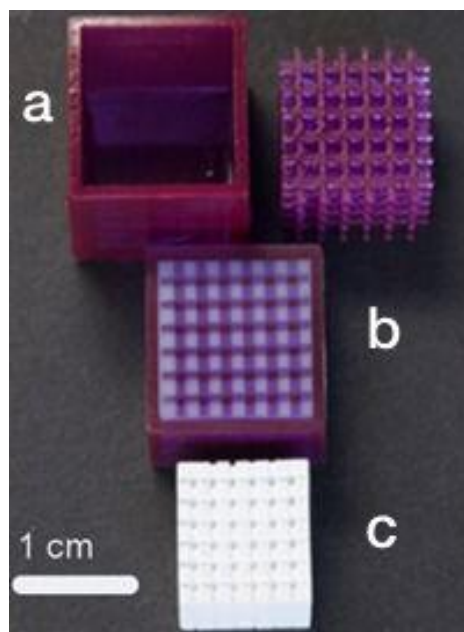


Figura 13: (a) Stampo originale fabbricato mediante stereolitografia; (b) Stampo riempito; (c) Struttura dello scaffold sinterizzata finale che mostra un restringimento dopo la sinterizzazione. Adattato da [14].

In questo studio una gamma di scaffold è stata prodotta con diverse dimensioni dei pori ma la stessa porosità complessiva (42%) per esplorare come la dimensione dei pori influenza la forza dell'impalcatura. Gli scaffold sono stati fabbricati con dimensioni dei pori superiore o uguale a 300  $\mu\text{m}$  poiché scaffold più piccoli sono difficili da fabbricare a causa della scarsa penetrazione dell'impasto ceramico negli stampi fini. Le proprietà meccaniche degli scaffold in ceramica sono risultate essere funzione delle loro dimensioni: scaffold di dimensioni dei pori più grandi mostrano valori di resistenza e tenacità alla frattura inferiori rispetto allo scaffold con dimensioni dei pori più piccole ovvero 300  $\mu\text{m}$ . Il modulo di Young di questi campioni varia da 0.5 a 2.9 GPa e la forza media, compresa tra 12 e 24 MPa, è simile all'intervallo inferiore della forza dell'osso corticale e leggermente maggiore della forza dell'osso spugnoso quindi le loro proprietà elastiche sono più vicine a quelle dell'osso trabecolare [14].

#### 4.2 Geometria cubica a faccia centrata/ a diamante

Oltre alla cella unitaria cubica semplice, esistono altre unità cubiche. Una di queste è la cella unitaria cubica a faccia centrata (FCC) o, anche definita, a diamante (DO). Esistono varie tipologie di cella cubica a faccia centrata come ad esempio FCC-Z, S-FCC, S-FCC-Z, e FCC-XYZ (Figura 11): FCC-Z è un reticolo con montanti diagonali disposti su tutti i piani e montanti addizionali solo nella direzione Z, S-FCC ha montanti diagonali disposti solo sui piani laterali, S-FCC-Z ha montanti diagonali disposti solo sui piani laterali e montanti aggiuntivi solo in direzione Z e, infine, FCC-XYZ è un reticolo con montanti diagonali disposti su tutti i piani inclusi e montanti addizionali nelle direzioni X, Y e Z [61].

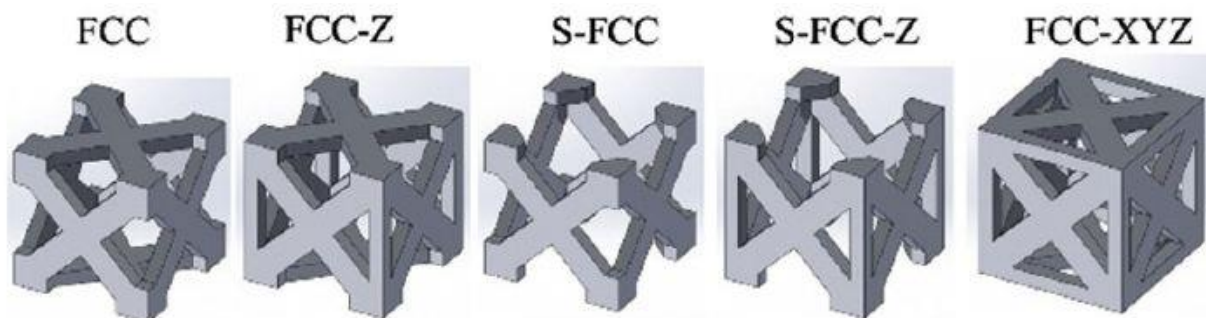


Figura 14: Cinque tipi di struttura reticolare basata su FCC. Adattato da [61].

Gatto et al. hanno svolto uno studio sperimentale che mira ad estendere la conoscenza su scaffold riassorbibili in policaprolattone/idrossiapatite (PCL/HA, rispettivamente 70% e 30% in peso), prodotti dalla tecnologia SLS e con strutture reticolari interne a diamante [62].

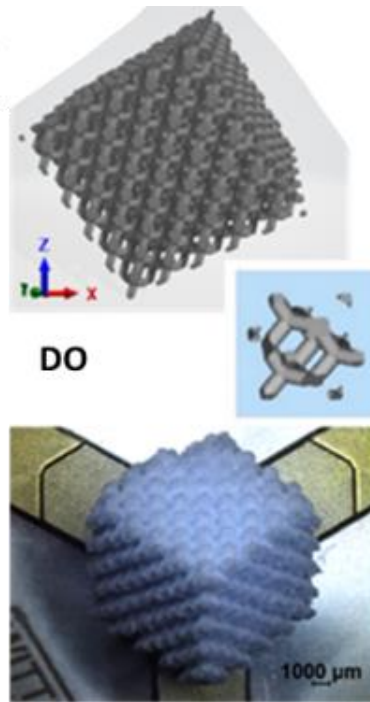


Figura 15: Schema della struttura reticolare a diamante. Adattato da [62].

La tecnologia SLS ha permesso di produrre scaffold PCL/HA riassorbibili con pori completamente interconnessi, privi di polvere residua, con porosità totale superiore al 50%. Questo valore di porosità ha consentito una facile rimozione della polvere non fusa con le procedure di pulizia convenzionali, migliorando così la colonizzazione cellulare. L'interazione degli scaffold con le cellule staminali mesenchimali umane ha consentito di studiare i processi degradativi della matrice PCL. I test di vitalità sono stati eseguiti su scaffold dopo 24 ore e poi dopo 4 giorni di incubazione di tali cellule mesenchimali umane mostrando un aumento della vitalità cellulare media durante il periodo di coltura da circa l'85% al 100%, indicando la non citotossicità del materiale e la capacità di supportare l'attaccamento, la proliferazione e la vitalità delle cellule stesse. Attraverso test meccanici sono stati identificati i valori di modulo elastico e di resistenza compressiva finale, rispettivamente di  $15 \pm 4$  MPa e  $2.8 \pm 0.5$  MPa, di questi scaffold in PLC/HA. Tali risultati sperimentali mostrano chiaramente che la geometria degli scaffold a diamante si adatta perfettamente all'intervallo di valori della resistenza alla compressione finale della regione mediana dell'osso trabecolare mandibolare umano in assenza di placche corticali. Pertanto, da un punto di vista meccanico, gli scaffold realizzati in questo studio sono adatti alla rigenerazione del tessuto osseo mandibolare umano [62]. Li et al. hanno, invece, realizzato scaffold con celle a diamante in ferro poroso attraverso una tecnica di stampa 3D (Figura 15). Sono stati condotti test in vitro sul comportamento di biodegradazione del materiale immergendolo in un fluido corporeo simulato all'interno di contenitori aperti in un bagno termostatico agitato a  $37^{\circ}\text{C}$  per un massimo di 28 giorni. È stato scoperto che le proprietà meccaniche del ferro poroso sono rimaste entro i valori riportati per l'osso

trabecolare anche dopo 28 giorni di biodegradazione. Diversi meccanismi sono stati trovati per determinare il comportamento di biodegradazione degli scaffold cilindrici alla periferia e al centro. Ciò suggerisce che il design topologico svolge un ruolo importante nella regolazione del comportamento di biodegradazione del ferro poroso. Il modulo elastico è diminuito dopo un giorno di immersione da circa 1775 MPa a 1600 MPa, ma è aumentato dal secondo giorno ed è rimasto pressoché invariato a 1700 MPa fino al quattordicesimo giorno per poi diminuire nuovamente al ventottesimo giorno diventando circa 1650 MPa. Invece, per quanto riguarda la resistenza allo snervamento, è diminuita gradualmente dal primo all'ultimo giorno da 23.7 a 22.4 MPa. Le proprietà meccaniche dei campioni di ferro poroso sono rimaste entro gli intervalli dei valori delle proprietà meccaniche riportati per l'osso trabecolare dopo 28 giorni di biodegradazione. A differenza di altre strutture porose basate sulla cella unitaria diamantata, le impalcature in ferro in questo studio hanno mostrato curve sforzo-deformazione lisce durante la compressione uniassiale senza fluttuazioni dopo la sollecitazione massima. Ciò potrebbe essere spiegato dall'elevata duttilità del ferro puro. Comportamenti simili sono stati osservati per altri materiali porosi altamente duttili, come strutture porose in titanio puro e tantalio [63].

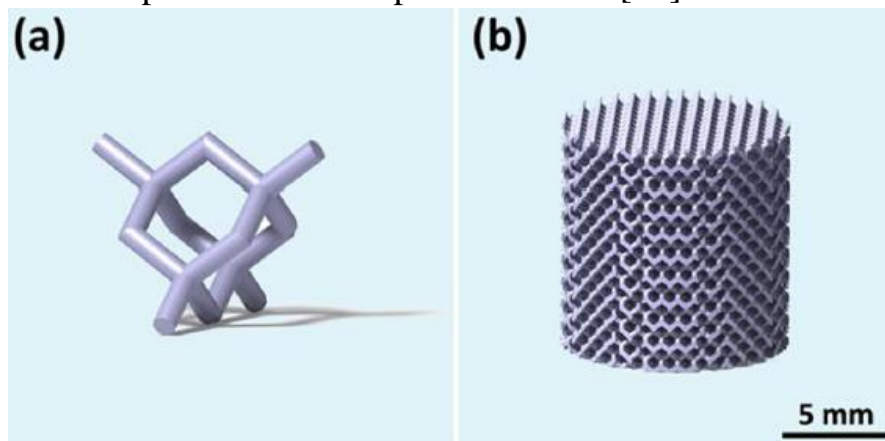


Figura 16: (a) Cella a diamante; (b) Design dello scaffold. Adattata da [63].

Successivamente, in uno studio di Zhang et al. sono state realizzate architetture porose con struttura a reticolo diamantato di lega Ti6Al4V (Figura 17). Tali scaffold sono stati fabbricati attraverso SLM. Sono stati creati più campioni con diversa porosità e diverso diametro dei montanti per verificare quale ha migliori proprietà meccaniche e biologiche [64].





Figura 17: Architetture biomimetiche di scaffold porosi di lega Ti6Al4V. (a) Singola unità simile a un diamante; (b) Campione standard per la prova meccanica; (c) Impianto per esperimento in vivo. Adattato da [64].

Attraverso test meccanici è stato rivelato che la resistenza finale dei campioni realizzati in questo studio varia da 36.45 MPa a 140.26 MPa e il modulo elastico varia da 1.21 GPa a 5.15 GPa con l'aumento della dimensione del montante. La biocompatibilità e l'effetto di riparazione, invece, sono stati studiati attraverso esperimenti in vivo su animali, ovvero su cani beagle realizzando nell'animale un danno alla testa femorale posteriore destra un mese prima dell'impianto. Il campione rivelatosi con proprietà più simili all'osso e quindi il più idoneo per la ricostruzione ossea, confrontando i dati ricavati dai test meccanici con i dati in letteratura, è quello con porosità oltre il 60% e diametro dei montanti circa di 0.4 mm. Tale campione è stato impiantato in sei Beagle ed è stato osservato che non si è verificata nessuna infezione dei siti chirurgici, dislocazione degli impianti o reazione avversa come infiammazione o reazione da corpo estraneo intorno ai siti di impianto. I Beagle zoppicano sulla gamba destra nelle prime due settimane, ma possono camminare liberamente dopo un mese dall'impianto. Dopo 4 mesi, gli impianti hanno poco effetto sul loro movimento e dopo 6 mesi nuovi tessuti ossei gradualmente sono cresciuti negli impianti porosi. Le gambe danneggiate sono state completamente riparate ed è stato difficile rilevare la ferita iniziale dall'andatura del cammino del beagle [64]. Uno studio concreto riguardante il reticolo diamantato di lega Ti6Al4V è stato svolto da Jetté et al. in cui si analizza la protesi totale d'anca. Gli steli femorali densi sono considerevolmente più rigidi delle ossa dell'ospite e ciò porta a complicazioni a lungo termine. Di conseguenza, è stato proposto un design dello stelo femorale in lega Ti6Al4V caratterizzato da una struttura porosa basata su un reticolo cubico diamantato per ridurre la rigidità e consentire la crescita interna del tessuto osseo. Tale struttura a diamante è stata selezionata poiché offre maggiore conformità rispetto ad altre strutture e si traduce in proprietà meccaniche quasi isotropiche. Inoltre, uno studio in vivo sulla crescita interna dell'osso condotto su tale struttura ha dimostrato un livello appropriato di penetrazione tissutale per gli impianti ortopedici portanti [65].

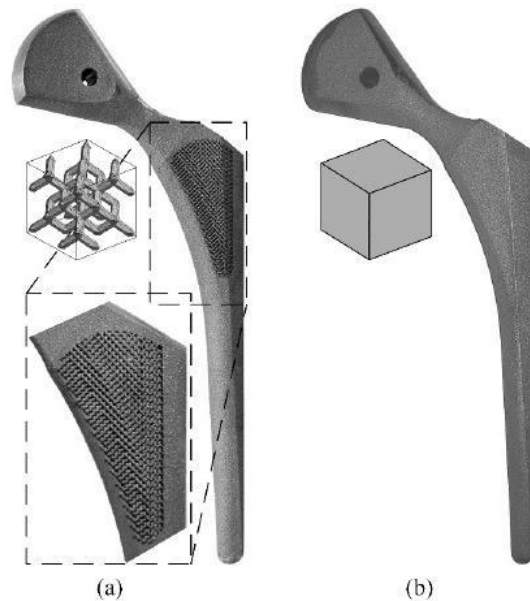


Figura 18: Steli femorali fabbricati con SLM. (a) Corpo dello stelo riempito con la struttura porosa ordinata (b) Stelo completamente denso. Adattata da [65].

Queste strutture porose a diamante hanno molti vantaggi rispetto ad altre microstrutture. In primo luogo, si mostrano più stabili sotto stress multidirezionale e hanno una resistenza meccanica isotropa. In secondo luogo, imitano le proprietà meccaniche dei tessuti ossei naturali. Il design dell'impalcatura a diamante/FCC ha un modulo di Young simile a quello dell'osso naturale e le porosità fino al 66% hanno proprietà meccaniche simili al tessuto osseo nativo. Inoltre, i pori 3D interconnessi sono vantaggiosi per la crescita ossea e per il trasporto di fluidi corporei, come le sostanze di nutrimento e i rifiuti. Siccome il processo di fabbricazione ha una notevole influenza sulla struttura dei pori, è necessario controllare attentamente i parametri di elaborazione, come la potenza del laser, la velocità di scansione del laser e lo spessore dello strato di polvere, durante la fabbricazione [64]. La morfologia del cubo ha moduli elastici più elevati rispetto a quella del diamante [55]. In generale, le strutture reticolari (compresa la struttura a diamante) che impiegano una cella unitaria con montanti rettilinei simili a travi e curve strette formano concentrazioni di stress, determinando difetti locali e riducendo così la vita a fatica [66]. Di contro la forma a diamante/FCC offre una distribuzione delle sollecitazioni più uniforme all'interno dei montanti rispetto ai modelli cubici o ottaedrici [67,68].

#### 4.3 Geometria cubica a corpo centrato

Uno scaffold a reticolo cubico a corpo centrato (BCC) è una struttura reticolare che ha una cella unitaria assemblata da quattro montanti lungo le diagonali del corpo di un cubo [69].

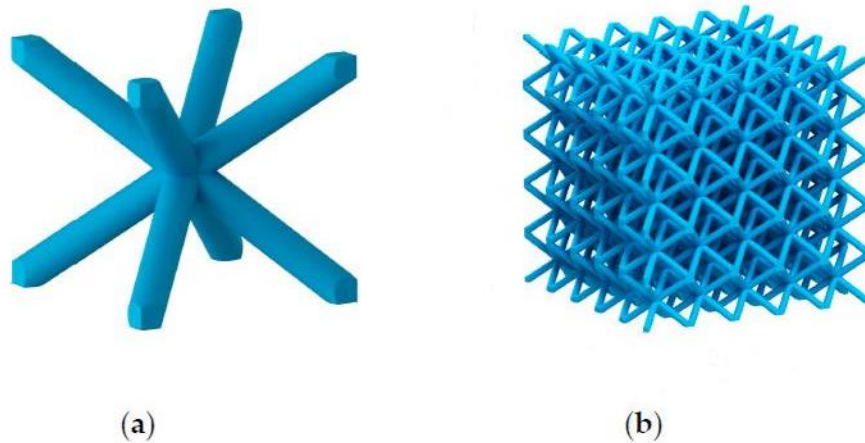


Figura 19: (a) Cella unitaria BCC; (b) Esempio di struttura reticolare BCC. Adattata da [69].

Se si aggiungono alcuni montanti all'unità BCC, la rigidità specifica e la resistenza specifica delle strutture corrispondenti, chiamate strutture BCC rinforzate, migliorano notevolmente. La Figura 20 mostra i due tipi di strutture BCC rinforzate: BCCZ e  $F_2$ BCC [70]. La cella unitaria BCCZ è una versione irrigidita di BCC con un montante verticale mentre la cella unitaria  $F_2$ BCC comprende due celle unitarie BCC [71].

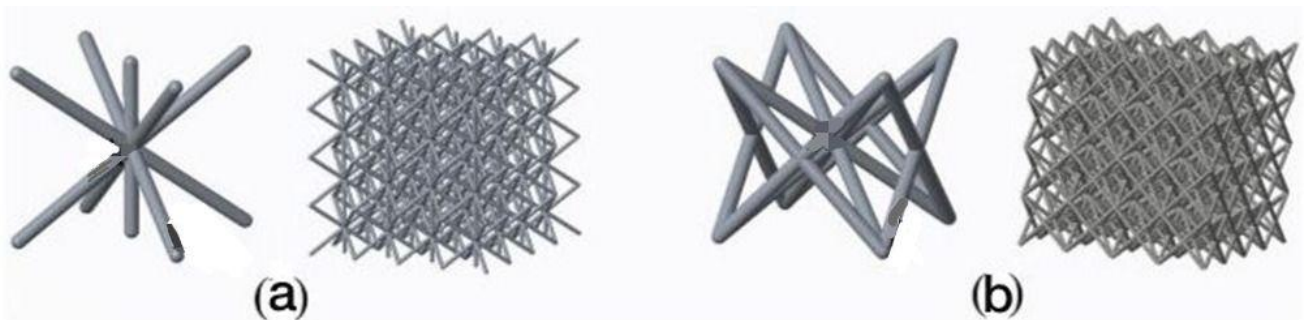


Figura 20: Unità reticolari e strutture corrispondenti: (a) BCCZ e (b)  $F_2$ BCC. Adattata da [70].

Strutture con celle a BCC rafforzate sono state analizzate in uno studio di Gümrük et al. in cui sono stati realizzati scaffold in acciaio inossidabile 316L, attraverso SLM. Sono stati prodotti diversi campioni con strutture BCC e BCCZ e con diverse dimensioni delle celle. Gli scaffold realizzati con celle BCC di dimensioni 2.5 mm hanno un modulo elastico di circa 17-22 MPa mentre scaffold con celle BCC di dimensioni di 1.25 mm hanno un modulo elastico di 220-378 MPa. Per quanto riguarda celle BCCZ di dimensioni 2.5 mm e 1.25 mm, i relativi scaffold hanno modulo elastico rispettivamente di 402-435 MPa e di 2054-2101 MPa. I risultati di questo studio hanno dimostrato che la migliore in termini di proprietà meccaniche di base in compressione è stata BCCZ. Le risposte meccaniche delle strutture BCC, incluso il modulo di elasticità, dipendono fortemente dalle condizioni al contorno; al contrario, le strutture BCCZ non sono molto influenzate da questi effetti, grazie all'esistenza di montanti verticali [71].

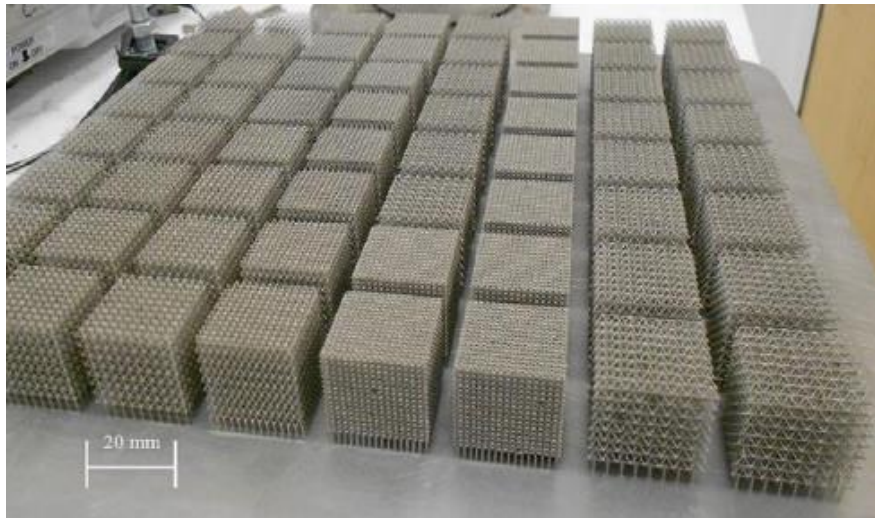


Figura 21: Un insieme di blocchi di microreticolo con diverse dimensioni delle celle. Adattata da [71].

Per analizzare la differenza tra scaffold con celle unitarie di diversa struttura sono stati realizzati scaffold con celle unitarie diamantate e a BCC attraverso SLM in lega Ti6Al4V porosa nello studio di Huo et al. [72] e nello studio di Hacisalihoğlu et al. [73].

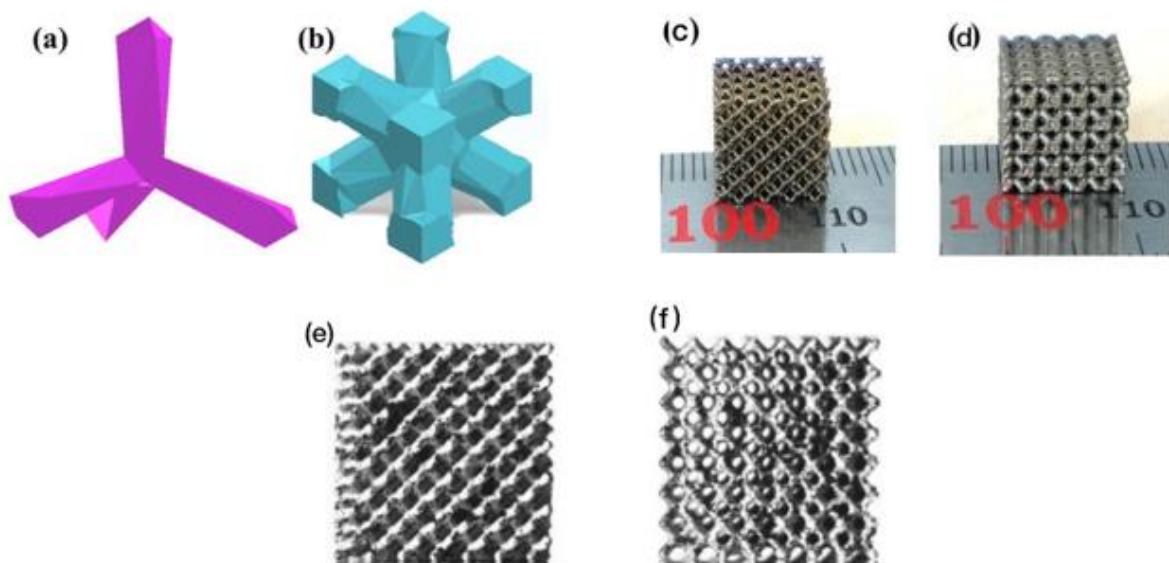


Figura 22: (a) cella unitaria a diamante [72]; (b) cella unitaria BCC [72]; (c) scaffold di lega TC4 con celle unitarie a diamante [72]; (d) scaffold di lega TC4 con celle BCC [72]; (e) scaffold di lega Ti-6Al-4V ELI con celle unitarie a diamante [73]; (f) scaffold di lega Ti-6Al-4V ELI con celle unitarie a BCC [73].

I sistemi reticolari BCC e a diamante hanno caratteristiche più simili in termini di resistenza alla compressione e comportamento alla deformazione rispetto ad altri sistemi reticolari [73]. Nonostante ciò, nello studio di Huo et al., rispetto agli scaffold diamantati, gli scaffold porosi BCC si sono mostrati avere superiore resistenza massima alla compressione. Infatti, la resistenza alla compressione finale degli scaffold porosi BCC preparati da SLM in lega Ti6Al4V è di 350–400 MPa, mentre la resistenza

alla compressione finale degli scaffold porosi diamantati è solo 35–40 MPa [72]. Di contro, i reticoli diamantati, nello studio di Hacisalihoğlu et al., a seguito di test meccanici, hanno mostrato un comportamento di deformazione più omogeneo rispetto ai reticoli a BCC [73]. Chowdhury et al. hanno realizzato, invece, scaffold con celle BCC in lega Ti25Nb in diverse porosità. Si è notato che l'aumento della porosità dal 29.29% al 78.58% ha causato un calo del modulo di Young effettivo da 57.9 a 12.21 GPa (riduzione del 78.91%) e della resistenza allo snervamento da 592.98 a 129.61 MPa (riduzione del 78.14%). L'intervallo di porosità in cui tali strutture imitano i comportamenti meccanici del femore è del 50%-70%. Di conseguenza, la microstruttura BCC offre una maggiore controllabilità della porosità e produce una distribuzione moderata e relativamente isotropica delle proprietà meccaniche sotto carico di compressione, flessione e torsione. Inoltre, l'aumento della proliferazione cellulare osservata negli scaffold porosi BCC ne fa una geometria importante per la progettazione di impianti siccome combina le caratteristiche delle strutture cubica e diamantata [74].

#### *4.4 Geometria a dodecaedro rombico*

Per verificare la differenza tra uno scaffold con celle unitarie a dodecaedro rombico (RD) e uno scaffold con celle unitarie a diamante sono stati realizzati due studi di Gatto et al. realizzando scaffold con queste geometrie sia in una miscela di polvere contenente il 70% in peso di policaprolattone (PLC) e il 30% in peso di idrossiapatite (HA) mediante SLS [62], sia in lega Ti6Al4V mediante EBM [75]. Al fine di valutare l'interazione dello scaffold sono stati effettuati test di vitalità con cellule staminali mesenchimali umane dopo 24 ore e 4 giorni di incubazione per entrambe le geometrie e i materiali. La geometria con celle a dodecaedro rombico fornisce un migliore ambiente 3D per l'adesione e la proliferazione delle cellule per la colonizzazione dello scaffold [62,75]. Siccome il modulo elastico degli scaffold, a dodecaedro rombico e a diamante, in Ti6Al4V è rispettivamente  $1.949 \pm 0.001$  GPa e  $1.622 \pm 0.001$  GPa e quello degli stessi scaffold ma in PLC/HA è rispettivamente  $15 \pm 4$  MPa e  $13 \pm 4$  MPa, la geometria a dodecaedro rombico si è rivelata più adatta per impianti portanti, mentre la geometria a diamante è preferibile per impianti soggetti a forze di torsione. Inoltre, da questi studi è anche emerso che le forze di compressione di scaffold con geometria a diamante e a dodecaedro rombico in Ti6Al4V sono rispettivamente di 99 MPa e 78 MPa e in PLC/HA sono rispettivamente di  $2.8 \pm 0.5$  MPa e  $2.6 \pm 0.4$  MPa. Questo dimostra che il comportamento a compressione degli scaffold è abbastanza simile al tessuto osseo naturale e segue le tendenze riportate in letteratura. Nonostante ciò, la resistenza alla compressione della struttura a diamante è maggiore di quella della struttura a dodecaedro rombico [68,75]. Per verificare ulteriormente le proprietà meccaniche di questa struttura sono stati realizzati studi da Epasto et al. e da Horn et

al. in cui sono stati costruiti campioni con celle unitarie a dodecaedro rombico di lega Ti6Al4V ELI utilizzando EBM [76,77]. Tale reticolo rombico si è rivelato essere una soluzione adatta per applicazioni in cui è richiesta una bassa rigidità, come gli impianti biomedici poiché hanno una buona resistenza alla compressione, circa 5-6 MPa [77]. Inoltre, è stato scoperto che, nei casi in cui è richiesta una struttura resistente agli urti, una cella unitaria di dimensioni ridotte è la scelta migliore [76–78].

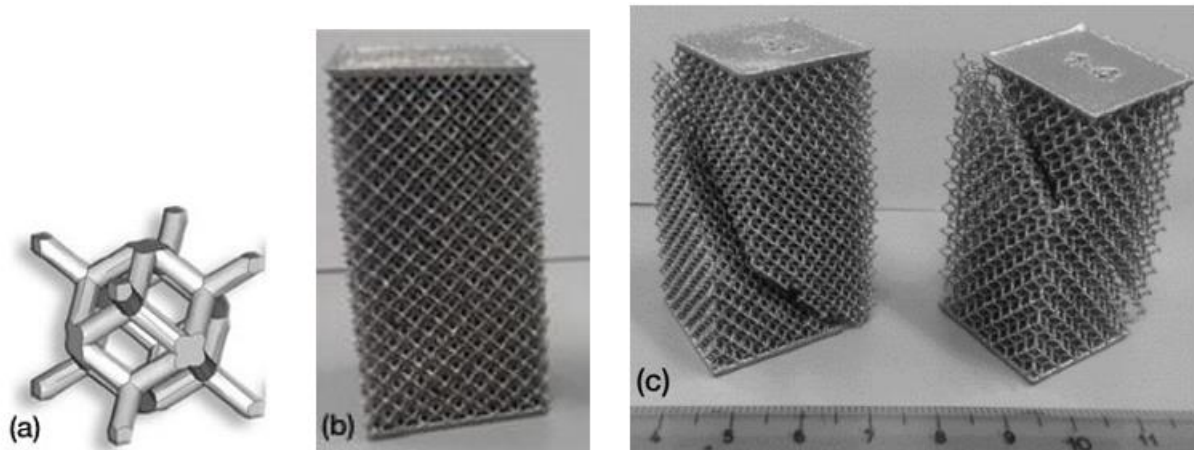


Figura 23: (a) Cella unitaria dodecaedro rombico; (b) Struttura reticolare a dodecaedro rombico; (c) Campioni dopo le prove di compressione. Adattata da [77].

Infine, è necessario prestare attenzione affinché la forma del dodecaedro sia progettata solo con angoli ottusi, poiché gli angoli acuti vengono facilmente danneggiati durante la fase di fusione della stampa [68].

#### 4.5 Geometria a traliccio di otetto

Nel modello a travatura reticolare di otetto, il nucleo cellulare unitario ottaedrico regolare è circondato da otto tetraedri, distribuiti sulle sue otto facce [79].

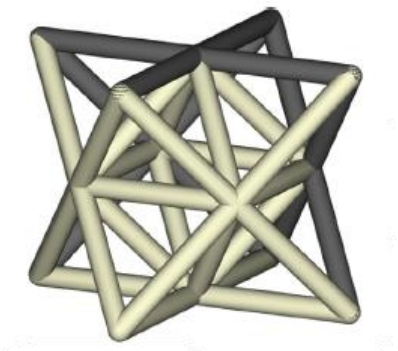


Figura 24: La cella unitaria dell'ottetto regolare. Adattata da [80].

In uno studio svolto da Ling et al. sono state realizzate strutture reticolari a traliccio di otetto attraverso il metodo SLA utilizzando due diverse resine polimeriche opportunamente denominate resina "grigia standard" e resina "durevole". La resina

“grigia standard” mostra un tipico comportamento fragile con rottura che si verifica a piccole deformazioni, mentre la resina “durevole” mostra un tipico comportamento duttile con fratture che si verificano a un livello di deformazione molto più elevato. La tenacità della resina duttile (durevole) è circa tre volte quella della resina più fragile (grigio standard).

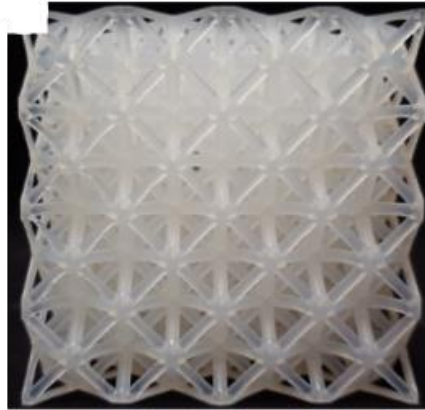


Figura 25: Campione realizzato in resina “durevole” attraverso SLA. Lunghezza del montante fissa a 10 mm. Adattato da [81].

Attraverso test meccanici, su tre campioni per ogni resina, si sono ricavati il modulo di Young e la tensione di snervamento della resina “grigia standard”, rispettivamente di 990 MPa e 36.3 MPa, e della resina “durevole”, rispettivamente di 301 MPa e 16.1 MPa. Le sollecitazioni di snervamento sia del campione di resina “grigia standard” che del campione di resina “durevole” aumentano in modo monotono con la densità relativa della struttura reticolare dell'ottetto e le eccellenti prestazioni del provino in resina “durevole” sotto carico di compressione multipla sono tali che questa struttura offre un buon potenziale per essere utilizzata come componente di assorbimento di energia per applicazioni a impatto multiplo [81]. Nello studio di Arabnejad et al., invece, sono stati analizzati gli effetti biologici della struttura a traliccio di ottetti impiantando scaffold in lega Ti6Al4V, realizzati attraverso SLM, in femori canini. Attraverso test meccanici, è risultato che, alla porosità del 75%, il modulo elastico equivale a  $1.37 \pm 0.18$  GPa mentre ad una porosità di 50/60% sta tra 3 e 4.5 GPa. Questa enorme diminuzione di modulo elastico ad alti valori di porosità è dovuta dal fatto che tale geometria ha un'elevata sensibilità ad errori di manifattura. Inoltre, tale topologia strutturale dimostra una precoce ed estesa crescita ossea entro 4 settimane, con una media del 36%, ed un ulteriore aumento del 58% entro 8 settimane. Tali studi hanno dimostrato che la quantità di crescita ossea è linearmente proporzionale alla porosità del campione [82]. Vi si trovano delle differenze, dal punto di vista delle proprietà meccaniche, tra la cella a diamante e quella ad ottetto. La cella a traliccio di ottetto ha migliore resistenza e rigidità nelle condizioni di pressione e torsione ma solo per la struttura completa, di fatto tale geometria mostra le sollecitazioni più basse rispettivamente di 341.3 MPa e 144 MPa rispettivamente nelle condizioni di pressione e torsione. La struttura a

diamante, invece, nelle due condizioni, ha uno stress, rispettivamente di 751.6 MPa e 558.4 MPa, uno spostamento, rispettivamente 5.197e-002 mm e 7.854e-002 mm, e una deformazione maggiori. La cella a otetto ha comportato spostamenti più piccoli, rispettivamente 2.287e-002 mm e 1.342e-002 mm [83]. Il tipo di cella unitaria è un fattore chiave per le proprietà biologiche e meccaniche delle strutture porose, per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto osseo [79]. In generale, l'integrazione di strutture reticolari in impianti ossei, come quello dell'anca, può migliorare il design generale abbassando la massa e mantenendo l'integrità strutturale. La stampa 3D può essere ampiamente utilizzata per progettare e produrre impianti con un comfort aggiuntivo, grazie alla leggerezza e alle proprietà meccaniche simili all'osso circostante, e per aumentare l'osteointegrazione grazie alla superficie aggiuntiva formata dai montanti della struttura reticolare. Inoltre, l'integrazione di strutture reticolari in impianti protesici riduce anche il costo degli impianti stessi realizzati con produzione additiva, poiché la diminuzione del volume si traduce in un minore utilizzo di materiale e tempi di stampa più rapidi. Per identificare i vantaggi di questa struttura nell'ambito degli impianti sono stati realizzati, nello studio di Cheah et al., scaffold a cella unitaria a traliccio di otetto in lega Ti6Al4V attraverso SLM. È stato verificato attraverso simulazioni che scaffold con questa struttura con porosità del 25% sono i più adatti in impianti dell'anca poiché comportano un aumento del 239% delle superfici aperte rispetto a struttura solida. Tutto ciò contribuisce a una migliore osteointegrazione dell'impianto dell'anca reticolare rispetto a un impianto dell'anca completamente solido [84].

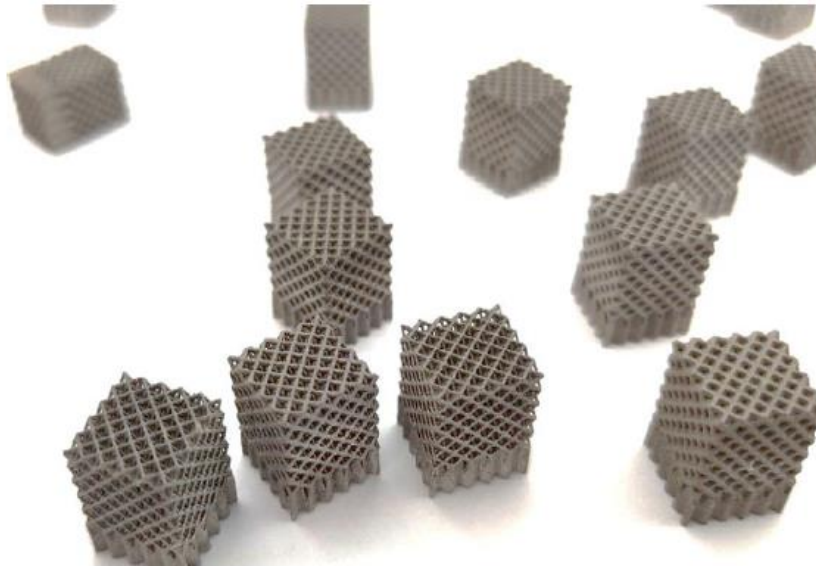


Figura 26: Strutture reticolari a traliccio ad otetto di lega Ti6Al4V ottenute tramite SLM. Adattato da [84].

#### 4.6 Geometria a cubo troncato

La struttura reticolare a cubo troncato è una morfologia relativamente nuova le cui proprietà meccaniche non sono state studiate in modo approfondito [85].





Figura 27: Cella unitaria a cubo troncato. Adattata da [86–88].

In uno studio realizzato da Ahmadi et al. reticoli in lega Ti6Al4V con celle a cubo troncato prodotti tramite SLM hanno mostrato una rigidità notevolmente maggiore rispetto alle configurazioni reticolari con celle a cubo semplice, a diamante e a dodecaedro rombico [87]. Secondo test meccanici dello studio di Hedayati et al., il modulo elastico delle strutture porose Ti6Al4V basate sulla cella unitaria troncata del cubo è inferiore a 10 GPa. Questi valori non superano i moduli elastici riportati in letteratura per l'osso corticale e ciò rende possibile l'uso di queste strutture porose per la sostituzione dell'osso senza causare schermatura da stress [85]. Inoltre, il cubo troncato si rivelato la migliore cella unitaria per bassi valori di carico e la peggiore per alti livelli di carico. Ciò è legato al fatto che tale cella permette la formazione di grandi quantità di osso per valori di carico bassi e di quantità molto piccole per quelli medio-alti. Questo sta ad indicare che essa è adatta in determinate situazioni di carico rispetto ad altre [89]. Negli ultimi anni, nello studio di Park et al. effettuato su questa cella unitaria sono state realizzate diverse strutture reticolari in lega Ti6Al4V attraverso SLM. Le forze di snervamento delle strutture a cubo semplice e cubo troncato sono rispettivamente 86.30 KN e 63.68 KN. Le due strutture reticolari hanno mostrato migliori proprietà meccaniche in condizioni di compressione assiale rispetto alle strutture cubiche a corpo centrato e a diamante con la stessa densità relativa [88].

#### 4.7 Superfici minime triplamente periodiche

Recentemente, nel campo della riparazione dei difetti ossei, gli scaffold porosi a gradiente hanno ricevuto maggiore attenzione perché hanno dimostrato di fornire un ambiente migliore per promuovere la rigenerazione dei tessuti grazie ai loro migliori requisiti meccanici e biologici [90,91]. I metodi di modellazione di superficie sono approcci altamente flessibili per la generazione di strutture che forniscono una rappresentazione compatta di superfici potenzialmente complesse e consentono la descrizione di architetture di scaffold utilizzando un'unica equazione matematica, con la capacità di introdurre diverse forme dei pori e caratteristiche architettoniche, inclusi i gradienti di dimensione dei pori. Questo metodo è stato utilizzato per modellare gli

scaffold in base alla classe di superfici note come superfici minime triplamente periodiche (TPMS) [92]. Tali superfici, spesso presenti in natura, sono definite matematicamente come curvatures superficiali infinite e periodiche [92,93]. Gli scaffold realizzati tramite TPMS sono generalmente prodotti utilizzando la produzione additiva [94].

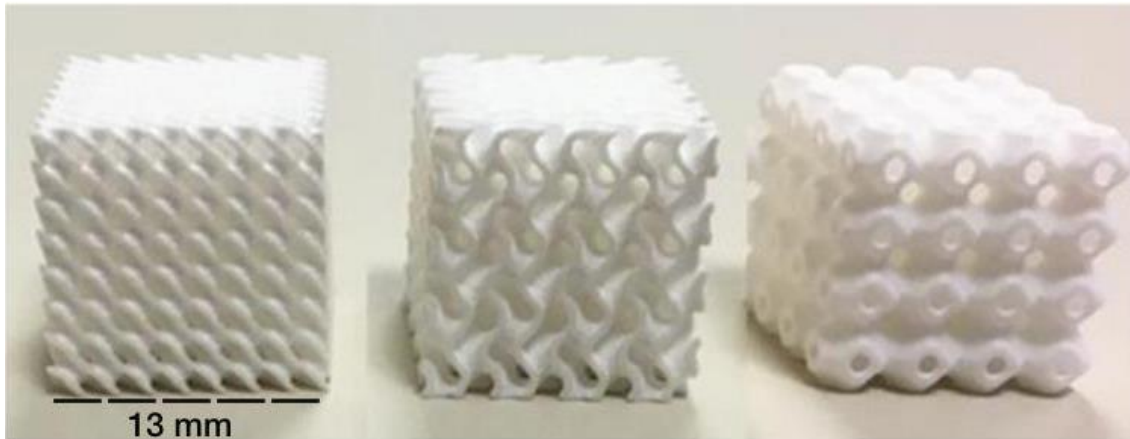


Figura 28: Scaffold con differenti geometrie create metodo TPMS. Adattata da [93].

Mishra et al. hanno realizzato dei campioni di strutture reticolari in PLA attraverso FDM con cella unitaria progettata utilizzando un TPMS primitivo che ricorda una semplice architettura cubica quando disposta (Figura 29) [95].

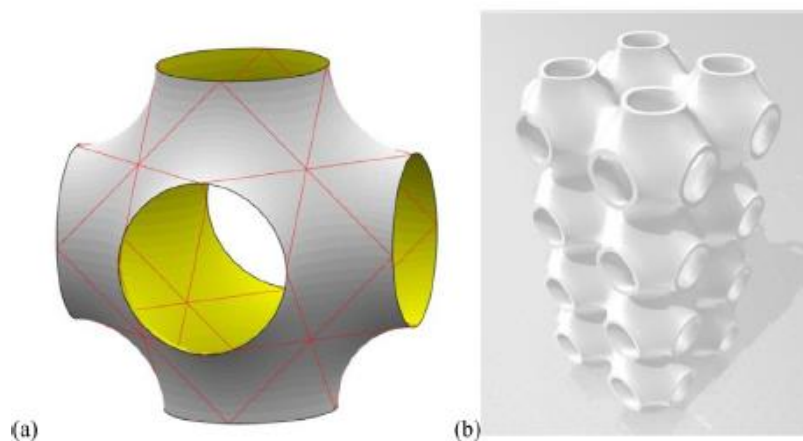


Figura 29: (a) Cella unitaria TPMS; (b) Campione progettato con struttura reticolare TPMS. Adattato da [95].

Attraverso test meccanici di compressione i campioni di PLA hanno mostrato un'azione di indurimento mentre la compressione procedeva a qualsiasi velocità di deformazione. Il modulo di elasticità (100–130 MPa) e la forza (4.3–5.3 MPa) della struttura TPMS in PLA si trovano nell'intervallo delle ossa trabecolari umane. Insieme alla biocompatibilità del materiale PLA, questo diventa un motivo appropriato per identificare i campioni TPMS in PLA come adatti per applicazioni biomediche [95]. Nello studio di Liu et al. sono stati, invece, proposti scaffold a gradiente di densità e a

gradiente nella dimensione delle celle di lega Ti6Al4V basati su TPMS e fabbricati da SLM. In questo studio è stato verificato che il metodo TPMS è un modo efficace per ottenere gradienti paragonabili al tessuto naturale rispetto sia alla topologia continua che all'interconnettività [91].

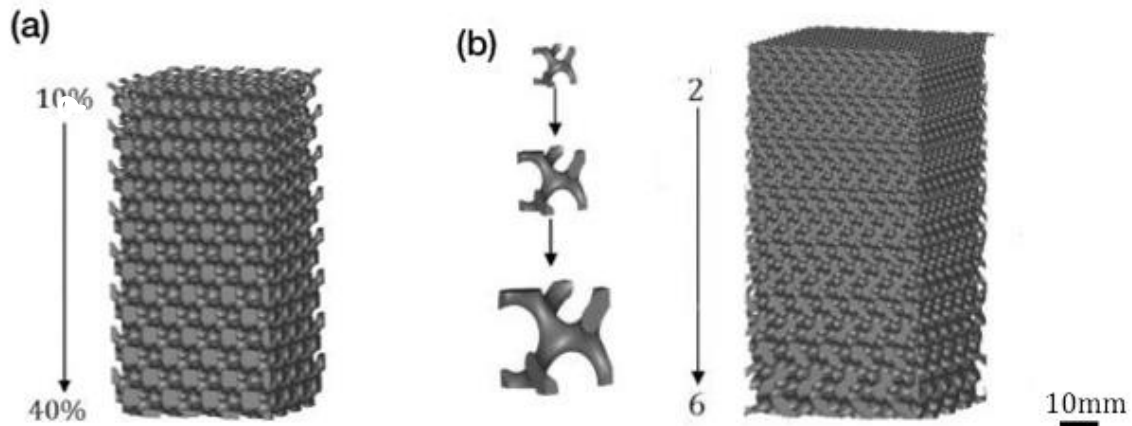


Figura 30: Modelli progettati di campioni con celle a gradiente (a) di densità relativa e (b) di dimensioni della cella. Adattato da [91].

Sono state eseguite prove di compressione per studiare i comportamenti meccanici di questi gradienti. Il modulo elastico e la tensione di snervamento dello scaffold a gradiente di dimensione di cella sono risultati essere rispettivamente  $3.8 \pm 0.26$  GPa e  $136.6 \pm 5.1$  MPa. Mentre per quanto riguarda lo scaffold a gradiente di densità è stato misurato il solo modulo elastico che corrisponde a  $2.1 \pm 0.16$  GPa. Questi due gradienti forniscono un modulo elastico comparabile con quello dell'osso corticale naturale, ed hanno, inoltre, una resistenza superiore, che favorisce l'aumento della longevità degli impianti. Attraverso questo metodo di progettazione, possono essere ottenute la porosità, l'area superficiale e le proprietà meccaniche adeguate. Inoltre, le strutture basate su TPMS hanno una superficie liscia e continua che da un effetto positivo sulla migrazione e proliferazione omogenea per la crescita cellulare [91]. Questo metodo mira allo sviluppo di scaffold con la relazione ottimale tra i livelli di porosità e rigidità per promuovere diversi tassi di crescita cellulare, poiché consentono progetti di scaffold omogenei completamente controllabili, partendo dal design della cella unitaria ripetibile [93]. In uno studio di Liao et al. scaffold modellati con il metodo TPMS con varie porosità a gradiente simili alla struttura graduata dell'osso umano sono stati preparati mediante fusione laser selettiva (SLM) con Ti6Al4V come materiale di costruzione. Le proprietà meccaniche e i comportamenti cellulari degli scaffold sono stati analizzati sistematicamente.

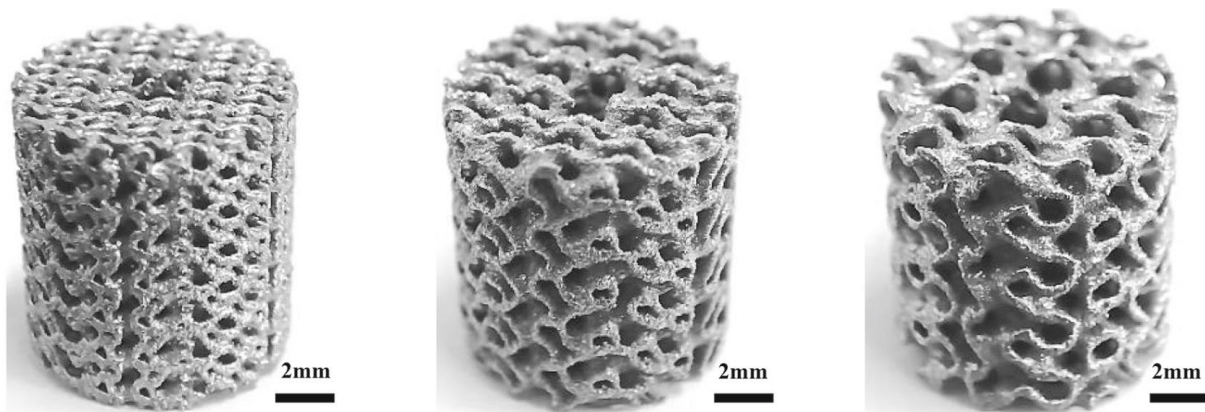


Figura 31: Scaffold modellati attraverso il metodo TPMS stampati con differenti porosità da SLM. Adattata da [96].

La porosità media di tutti i campioni costruiti varia dal 55% al 71% e le dimensioni medie dei pori variano da 333  $\mu\text{m}$  a 674  $\mu\text{m}$ . I test di compressione hanno mostrato che il modulo di Young varia da 2.7 a 7.4 GPa e la resistenza allo snervamento varia da 233 a 520 MPa. Il modulo di Young e la resistenza allo snervamento diminuiscono con l'aumento delle dimensioni dei pori e della porosità. Il modulo elastico degli scaffold modellati attraverso TPMS è simile a quello del tessuto osseo umano e ha una buona adattabilità meccanica. Tuttavia, essendo il modulo elastico e la massima resistenza alla compressione degli scaffold TPMS molto simili a quelli dell'osso spugnoso umano, tali impalcature sono più adatte per la riparazione e la sostituzione di grandi difetti ossei in parti non portanti. Per i test biologici sono state utilizzate le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo ottenute da ratti di tre settimane. Tali cellule sono state seminate su ciascun campione di scaffold posto in piastre da 24 pozzetti con un mezzo di coltura di 1 ml. Gli scaffold sono stati inseriti in un'incubatrice a una temperatura costante di 37 °C per misurarne la vitalità cellulare attraverso la distribuzione e la proliferazione cellulare dopo 48 ore, 72 ore e 96 ore. Questi test hanno mostrato la biocompatibilità prevista. L'adesione cellulare esisteva sulla superficie esterna e interna di tutti gli scaffold e le cellule erano densamente locate sulla superficie dello scaffold. Con l'aumento del tempo di incubazione, la capacità di immigrazione cellulare su queste impalcature è maggiore. Inoltre, siccome la dimensione eccessiva dei pori diminuisce la superficie totale e l'adesione cellulare, una porosità sufficiente potrebbe aumentare la superficie totale e la connettività degli scaffold, in modo da promuovere l'adesione delle cellule osteoblastiche [96]. Vijayavenkataraman et al. hanno esplorato, in un recente studio, l'uso di scaffold ossei basati sulla modellazione attraverso TPMS e prodotti additivamente con materiale ceramico. Sono state prese in considerazione un totale di 12 diverse celle unitarie TPMS con dimensioni dei pori comprese tra 500 e 1000  $\mu\text{m}$  e porosità superiore al 50% [97].

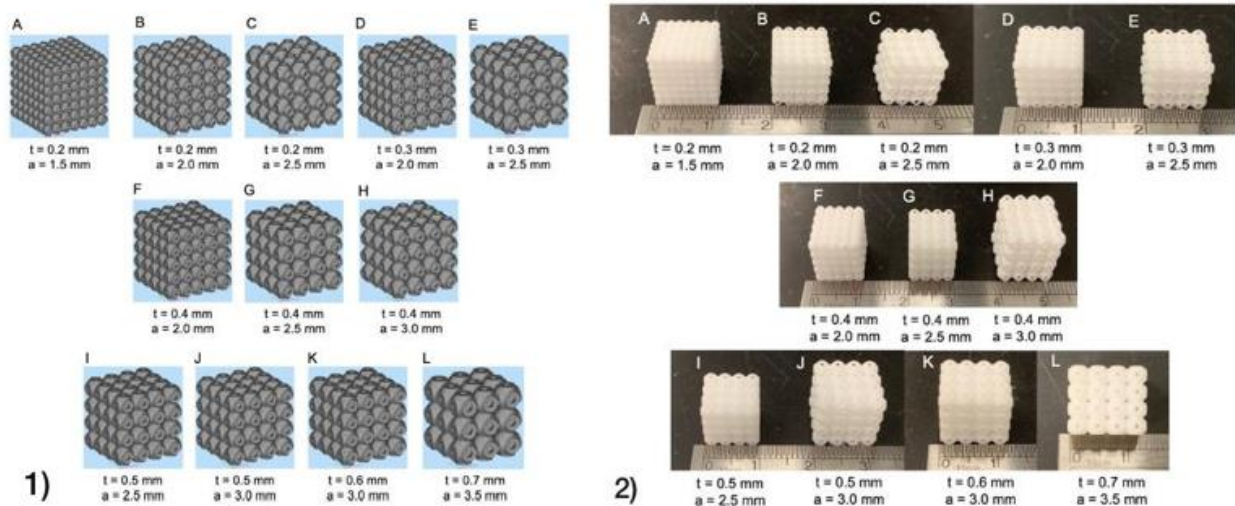


Figura 32: (1) (A–L) Modelli 3D dei dodici reticoli basati su TPMS. (2) (A–L) Strutture stampate in 3D dei dodici reticoli basati su TPMS. La lettera ‘a’ sta ad indicare la dimensione della cella mentre la lettera ‘t’ indica lo spessore. Adattata da [97].

I test meccanici su questi scaffold sono stati realizzati virtualmente tramite un software. A seconda della dimensione delle celle e dello spessore degli scaffold, i valori di modulo elastico variano tra 1.5 GPa e 4 GPa, mentre i valori di tensione di rottura variano tra 10 MPa e 100 MPa. Si può notare che il modulo di Young delle strutture di questo studio diminuisce all'aumentare delle dimensioni delle celle. La densità delle strutture è correlata al modulo di Young; di conseguenza, controllando questi valori di densità si possono ottenere strutture con il modulo di Young desiderato [97].

#### 4.8 Tassellatura Voronoi

Nella tassellatura Voronoi la distribuzione dei punti influisce sulla distribuzione dei poliedri di Voronoi e delle parti solide, e quindi influisce sulla modifica del modulo elastico della struttura [51]. La produzione di strutture con geometrie così complesse viene effettuata attraverso la produzione additiva con fasi di post-elaborazione limitate. Ad esempio, la fusione laser selettiva (SLM) è in grado di produrre strutture con pareti sottili o canali nascosti, quindi, è un adatto processo di produzione di reticoli porosi progettati da qualsiasi forma di tassellatura di Voronoi [49]. Nello studio di Senatov et al. è stato realizzato un campione di scaffold osseo in polietilene ad altissimo peso molecolare (UHMWPE) con tassellatura Voronoi, realizzando prima un negativo in PLA che viene poi riempito di UHMWPE. Ciò accade perché la stampa 3D non è direttamente applicabile a questo tipo di polietilene a causa della sua elevata viscosità [98].

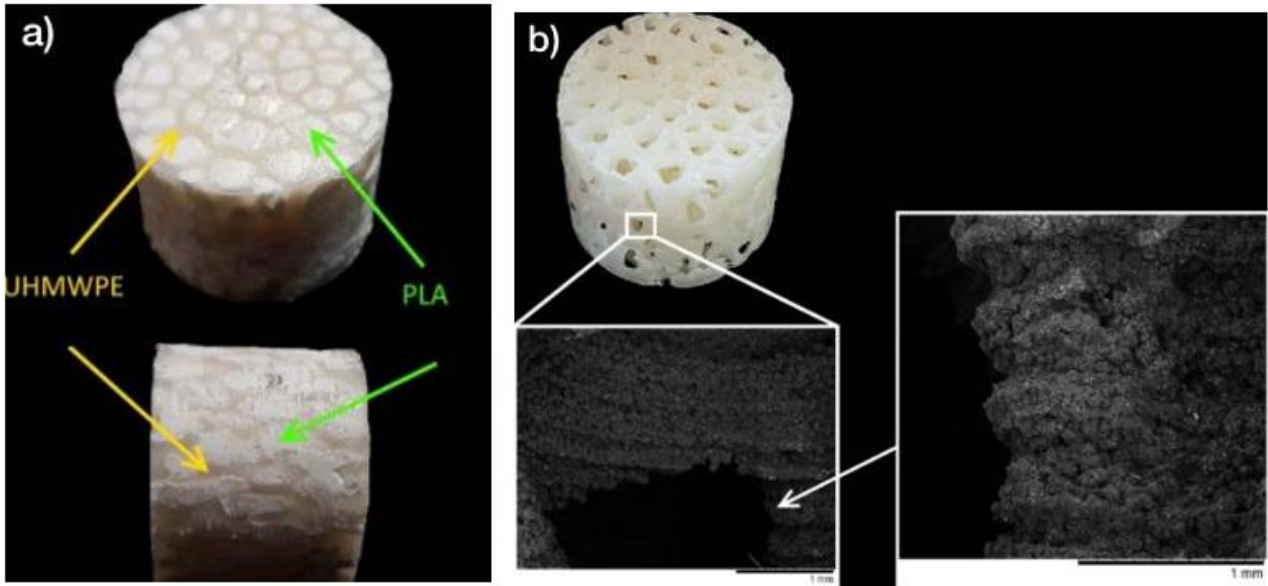


Figura 33: (a) L'aspetto di un campione composito PLA negativo e UHMWPE positivo; (b) Macro e microstruttura dello scaffold in UHMWPE. Adattata da [98].

A seguito di test meccanici in compressione su questo campione sono risultati una forza di compressione ed un modulo elastico rispettivamente di  $2150 \pm 613$  MPa e  $18.5 \pm 5.2$  MPa. Le proprietà meccaniche di questo scaffold corrispondono strettamente alle caratteristiche dell'osso trabecolare nativo, in particolare al suo modulo di Young. La resistenza dell'impalcatura in UHMWPE è almeno il 10% superiore a quella dell'osso trabecolare naturale [98]. In uno studio successivo di Fantini e Curto sono stati sviluppati campioni di scaffold in lega Ti6Al4V con tassellatura Voronoi implementata in Rhinoceros 5 con l'editor di plug-in per algoritmi grafici Grasshopper [99].

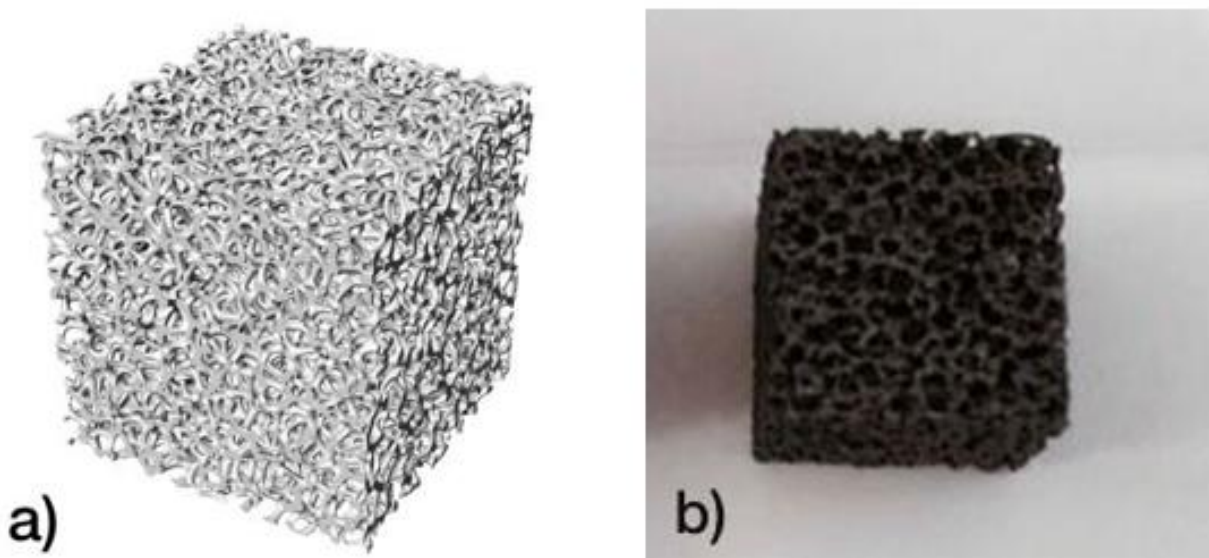


Figura 34: (a) Modello 3D dell'impalcatura progettata; (b) Campione in lega Ti6Al4V dello scaffold ( $10 \times 10 \times 10$  mm). Adattata da [99].

Per il test di producibilità lo scaffold osseo cubico è stato progettato in modo efficiente ed intuitivo con porosità controllata (80%) e dimensione media dei pori (0,800 mm) impostando i corrispondenti parametri di input adeguati nel processo interattivo, in termini di fattore di scala e numero di semi. La scelta dei valori target di porosità e dimensione media dei pori è stata realizzata per riprodurre l'architettura dell'osso trabecolare naturale. Come riportato in letteratura, un osso trabecolare ha una porosità variabile nell'intervallo [50% ÷ 90%], mentre la crescita ossea dipende da una dimensione dei pori variabile nell'intervallo [300 ÷ 800  $\mu\text{m}$ ]. In ogni caso, diversi valori di porosità e dimensione media dei pori possono essere facilmente ottenuti modificando i due parametri di input del processo interattivo. Questi risultati hanno mostrato che questo approccio è fattibile per la progettazione e la produzione di forme complesse e potrebbe essere applicabile ad altre tecnologie di produzione [99]. Anche Wang et al., nel loro studio, hanno fabbricato campioni porosi in lega Ti6Al4V basati sulla tassellatura di Voronoi con diversi gradi di porosità e irregolarità attraverso SLM. Il controllo dei punti di semina è fondamentale per il successo della modellazione di scaffold irregolari porosi. Ricerche precedenti hanno preferito generare punti tridimensionali in modo casuale. Tuttavia, c'è uno scarso controllo di questi punti casuali e la morfologia e le proprietà meccaniche hanno una scarsa ripetibilità. In questo studio, le strutture porose irregolari controllabili sono state progettate utilizzando il software CAD Grasshopper e la dimensione dei pori e dei montanti è stata controllata introducendo, anche in questo studio, il coefficiente di scala; quindi, quando vengono forniti i punti di semina, i diametri dei pori e dei montanti possono essere regolati dal coefficiente di scala. È in questo modo che è stata ottenuta anche la distribuzione a gradiente dei punti nell'asse z [52].

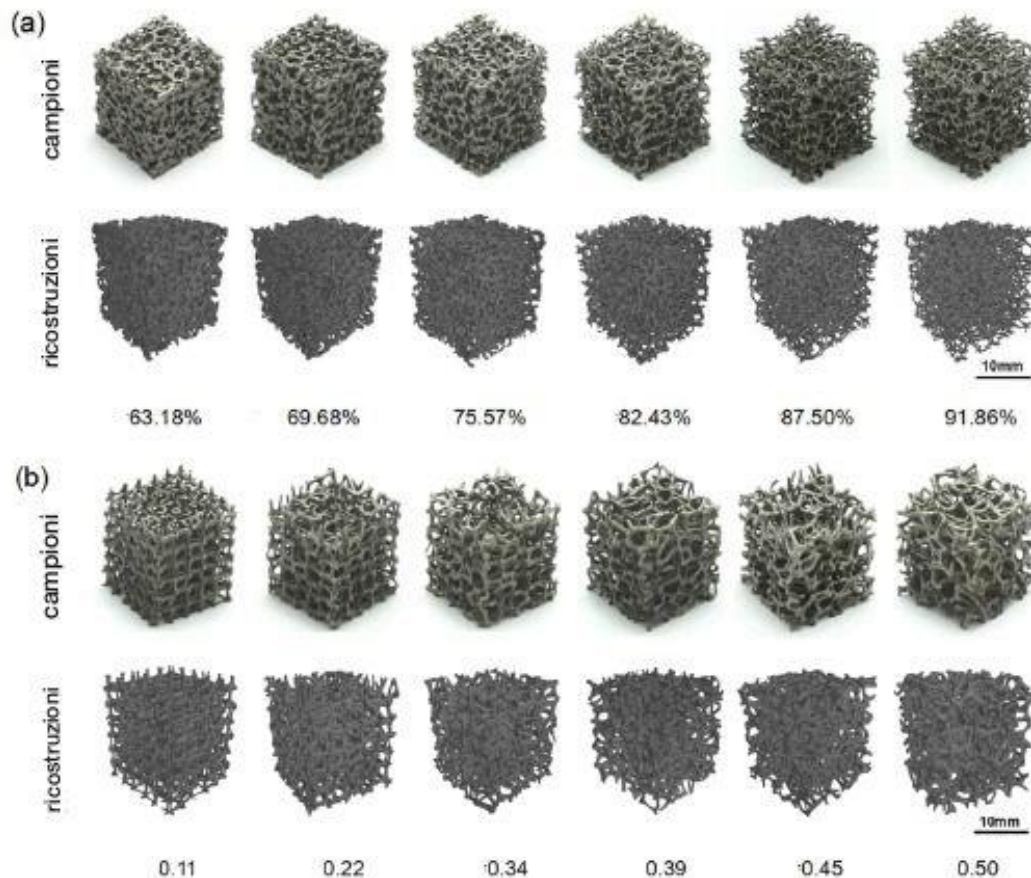


Figura 35: Strutture porose con diverse (a) porosità e (b) irregolarità. Adattata da [52].

Aumentando la porosità da 60 % a 95 % il modulo elastico varia gradualmente da circa 2.3 GPa a circa 0.1 GPa, mentre la resistenza alla compressione varia da circa 120 MPa a circa 0.1 MPa. Aumentando, invece, l'irregolarità della struttura il modulo elastico diminuisce da 1.35 GPa a 0.9 GPa mentre la resistenza alla compressione fluttua in un range di circa 27-33 MPa. Di conseguenza, all'aumento dell'irregolarità, il modulo elastico ha mostrato una forte tendenza al ribasso mentre la resistenza alla compressione ha mostrato un'ampia gamma di fluttuazioni. Tale resistenza, però, diminuisce a bassi livelli di irregolarità quindi aumentando quest'ultima si può ottenere una struttura porosa con elevata resistenza ma bassa rigidità. La diminuzione di porosità, causata dalla diminuzione dei diametri dei montanti e controllata dal coefficiente di scala, ha provocato il decadimento della rigidità dei montanti e ha quindi reso la struttura porosa più facilmente deformabile. In generale, i moduli elastici dei campioni porosi presentano un'elevata irregolarità che varia da 0.14 GPa a 2.37 GPa e le resistenze alla compressione variano da 1.94 MPa a 116.61 MPa [52]. Un altro scaffold in Ti6Al4V è stato realizzato nello studio di Liang et al. tramite SLM e basato sulla tassellatura di Voronoi con piena connettività. Gli scaffold porosi con diverse porosità e irregolarità sono stati modellati attraverso il software CAD (Computer Aided Design) Rhinoceros con un plug-in Grasshopper [100].



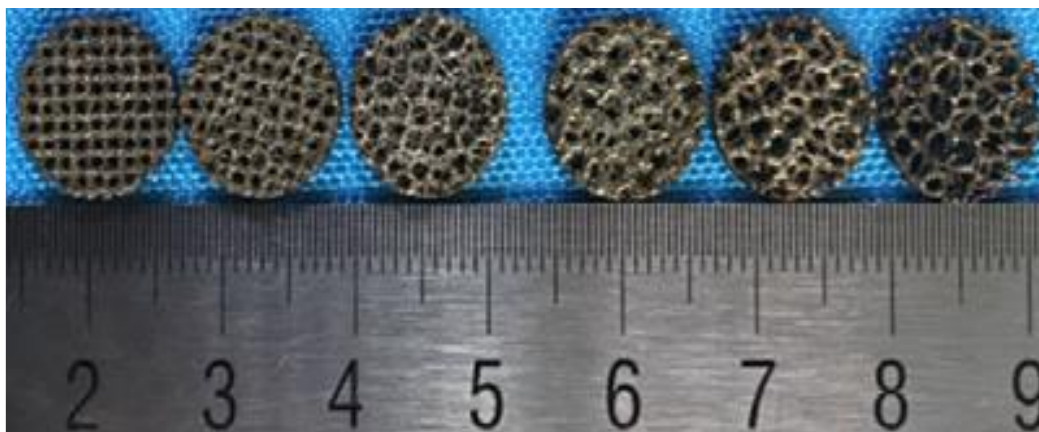


Figura 36: Campioni con tassellatura Voronoi e con diverse porosità e irregolarità. Adattato da [100].

In questo studio sono stati effettuati test in vitro e test meccanici. Una coltura cellulare in vitro è stata effettuata utilizzando cellule MG63, una linea cellulare utilizzata per lo studio del differenziamento osteoblastico. Gli scaffold sono stati pre-umidificati con terreno di coltura cellulare. Per ogni scaffold, 20.000 cellule MG63 sono state seminate a goccia e incubate staticamente per 4 ore a 37°C per facilitare l'attaccamento cellulare. Gli scaffold seminati di cellule sono stati trasferiti dopo 4 ore su una piastra da 24 pozzetti e coltivati in terreno di coltura, rinfrescato ogni 2 giorni. I test vengono effettuati dopo 1, 3 e 14 giorni. Gli attuali risultati sperimentali della coltura in vitro hanno dimostrato che gli scaffold irregolari in Ti6Al4V fabbricati da SLM sulla base della tassellatura di Voronoi sono favorevoli all'adesione e alla diffusione cellulare; essi hanno il potenziale di promuovere efficacemente le cellule MG63 verso la differenziazione degli osteoblasti. A seguito di test meccanici, tali scaffold, costruiti con porosità del 48.83%–74.28%, presentano prestazioni meccaniche soddisfacenti, un intervallo di modulo elastico di 1.93–5.24 GPa e un intervallo di resistenza massima di 44.9–237.5 MPa. Sono nello stesso livello di rigidità dell'osso spongioso ma hanno una capacità di resistenza allo stress più eccellente simile all'osso corticale. In conclusione, il presente studio ha rivelato che l'impalcatura trabecolare fabbricata da SLM come questa in Ti6Al4V basata sulla tassellatura di Voronoi ha la possibilità di un'applicazione ortopedica grazie alle sue proprietà meccaniche controllabili e al potenziale vantaggio di migliorare la differenziazione degli osteoblasti [100]. Le prestazioni delle strutture porose possono essere controllate dal progetto iniziale della microstruttura. Un buon design strutturale può eguagliare accuratamente le prestazioni dell'osso naturale. Lo studio delle proprietà meccaniche e della permeabilità della struttura porosa può aiutare ad affrontare diversi problemi, tra cui la protezione dallo stress e la crescita ossea nelle strutture ossee biomimetiche esistenti, e può promuovere anche l'adesione cellulare, la migrazione e l'eventuale nuovo attacco osseo [101].

Tabella 4: Cellule utilizzate nei test di proliferazione delle varie geometrie.

<b>Cellule</b>	<b>Intervalli temporali degli studi effettuati</b>	<b>Riferimenti</b>
<i>Cellule staminali mesenchimali umane</i>	24 ore, 4 giorni.	[62,75]
	Sette giorni	[60]
<i>Cellule staminali mesenchimali del midollo osseo ottenute da ratti di tre settimane</i>	48 ore, 72 ore e 96 ore.	[96]
<i>Cellule MG63</i>	1, 3 e 14 giorni	[100]

Tabella 5: Animali sottoposti a test sperimentali nei vari studi in letteratura.

<b>Animali</b>	<b>Numero di animali testati</b>	<b>Intervalli temporali degli studi effettuati</b>	<b>Sito anatomico di impianto</b>	<b>Riferimenti</b>
<i>Conigli neozelandesi adulti sani</i>	24	Sacrificati casualmente a 2 mesi, 4 mesi, 6 mesi o 12 mesi.	Dischi intervertebrali a 3 livelli: L3-L4, L4-L5 e L5-L6.	[60]
<i>Cani Beagle</i>	6	Monitorati dopo due settimane, un mese, 4 mesi e 6 mesi.	Testa femorale destra.	[64]

## 5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Ogni struttura descritta in questo elaborato presenta vantaggi e svantaggi che sono riassunti nella Tabella 6.

Tabella 6: Vantaggi e svantaggi delle geometrie analizzate.

<b>Geometria</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b><i>Cubica semplice</i></b>	È la struttura più semplice da realizzare.	Avendo montanti orizzontali o verticali e non diagonali, ha molti pori spuri che diminuiscono le proprietà elastiche.
<b><i>Cubica a faccia centrata (FCC/a diamante)</i></b>	Le proprietà meccaniche rimangono anche dopo il degrado; Presenta una distribuzione delle sollecitazioni più uniforme rispetto ai modelli cubici semplici; Si adatta perfettamente all'intervallo di valori della resistenza alla compressione finale dell'osso trabecolare mandibolare umano in assenza di placche corticali.	Assorbimento di energia non buono; Il processo di fabbricazione influenza la struttura dei pori.
<b><i>Cubica a corpo centrato (BCC)</i></b>	Design semplice; Facile da fabbricare; Presenta maggiore controllo sulla porosità; Rispetto alla struttura a diamante ha una superiore resistenza massima alla compressione.	Ha un comportamento di deformazione meno omogeneo rispetto alla struttura a diamante.
<b><i>A dodecaedro rombico</i></b>	Fornisce un migliore ambiente 3D per l'adesione e la proliferazione delle cellule. Adatta per applicazioni in cui è necessaria una bassa rigidità.	Ha una resistenza a compressione inferiore rispetto a quella della struttura a diamante.
<b><i>A traliccio di otetto</i></b>	Ha un buon potenziale per essere utilizzata come componente di assorbimento di energia per applicazioni ad impatto multiplo.	Difficile da fabbricare.
<b><i>A cubo troncato</i></b>	Ha migliori proprietà meccaniche in condizioni di compressione assiale rispetto alle strutture BCC e FCC.	Permette la formazione di grandi quantità di osso per valori di carico bassi mentre quantità molto piccole per carichi medio-alti: non è adatta per tutte le situazioni di carico.
<b><i>TPMS</i></b>	Permeabilità molto elevata che porta a migliori proprietà di trasporto di massa.	La ripetizione degli elementi nelle tre direzioni non è ottimale per imitare l'osso nativo.
<b><i>Tassellatura Voronoi</i></b>	La sua anisotropia aiuta a imitare l'osso nativo.	La vita a fatica degli impianti progettati con questa geometria è ancora incerta.

Per quanto riguarda queste geometrie, possiamo fare diverse considerazioni. Dal punto di vista della letteratura, risultano presenti molti più studi di scaffold ossei realizzati in leghe metalliche, principalmente in lega Ti6Al4V, un biomateriale metallico di successo grazie alle sue caratteristiche di resistenza meccanica e di biocompatibilità superiori rispetto ad altri biomateriali presenti in commercio. Ognuna di queste geometrie (dalla più semplice alla più complessa) ha potenziali applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti ossei poiché ogni struttura si avvicina sia meccanicamente che biologicamente al tessuto osseo umano. Successivamente è stato osservato che il comportamento meccanico, le proprietà meccaniche e i meccanismi di rottura delle strutture porose dipendono fortemente dal tipo e dalle dimensioni delle celle unitarie di cui sono fatte le strutture porose. La maggior parte delle strutture non parametriche utilizzate nella realizzazione degli scaffold sono simili fra loro poiché rappresentano solamente piccoli cambiamenti a strutture semplici. Ad esempio, scaffold con celle a BCC hanno una maggiore resistenza a compressione rispetto a scaffold basati su celle FCC e di conseguenza le due tipologie di impalcature hanno caratteristiche meccaniche differenti seppur si basano entrambe sulla struttura cubica. Ciò che risulta dallo studio delle geometrie non parametriche è che ognuna di esse ha caratteristiche differenti e ognuna sarebbe adattabile a situazioni differenti. La struttura, però, è comunque geometrica e quindi meno simile all'osso naturale rispetto alle geometrie parametriche, in particolare la tassellatura di Voronoi. Inoltre, ogni geometria, seppur in quantità differente, risente del processo di fabbricazione. Per quanto riguarda le strutture parametriche le impalcature modellate attraverso il metodo TPMS e la tassellatura di Voronoi hanno caratteristiche molto più simili all'osso trabecolare umano poiché hanno design meno geometrici. Attualmente, lo sviluppo degli scaffold modellati attraverso la tassellatura di Voronoi è in aumento poiché tali impalcature mostrano una casualità superiore. Sebbene l'applicazione della tassellatura di Voronoi nella progettazione abbia un ampio futuro, tuttavia, per aumentare sostanzialmente l'uso di queste forme di progettazione negli impianti medici, è necessario affrontare diverse sfide. La vita a fatica degli impianti progettati con la tassellatura di Voronoi, ad esempio, è ancora incerta e per questo motivo, dovrebbero essere eseguite ulteriori prove su queste impalcature. Inoltre, devono essere considerati i limiti della tecnologia di stampa 3D: l'errore e l'accuratezza delle diverse tecnologie devono essere valutati per produrre strutture biomimetiche complesse. In conclusione, la tassellatura selettiva di Voronoi rimane un modo efficace per introdurre l'anisotropia globale e locale in un'impalcatura porosa biomimetica ed apre la strada alla fabbricazione di impianti biomimetici personalizzabili, utilizzando la produzione additiva, con proprietà meccaniche regolabili in base alla geometria ossea intrinseca di un sito anatomico specifico in un paziente.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA:

- [1] Buck D W and Dumanian G A 2012 Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals *Plastic and Reconstructive Surgery* **129** 1314–20
- [2] Wehrli F W 2007 Structural and functional assessment of trabecular and cortical bone by micro magnetic resonance imaging *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **25** 390–409
- [3] Reznikov N, Bilton M, Lari L, Stevens M M and Kröger R 2018 Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale *Science (1979)* **360**
- [4] Clarke B 2008 Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* **3 Suppl 3**
- [5] Rho J-Y, Kuhn-Spearing L and Zioupos P 1998 *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone* vol 20
- [6] Bisht B, Hope A, Mukherjee A and Paul M K 2021 Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft *Annals of Biomedical Engineering* **49** 1128–50
- [7] Robling A G, Castillo A B and Turner C H 2006 Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling *Annual Review of Biomedical Engineering* **8** 455–98
- [8] Fattore A del, Teti A and Rucci N 2012 *Bone cells and the mechanisms of bone remodelling* 2. Introduction 2.1. The bone tissue 2.2. Bone as a central tissue: cross-talk with other organs 2.2.1. Bone and immune system 2.2.2. Bone and kidney 2.2.3. Bone and adipose tissue 2.2.4. Serotonin-mediated control of bone mass 2.2.5. Bone and glucose metabolism 2.2.6. Bone and male infertility 3. Cells of the bone tissue 3 vol 4
- [9] Tresguerres F G F, Torres J, López-Quiles J, Hernández G, Vega J A and Tresguerres I F 2020 The osteocyte: A multifunctional cell within the bone *Annals of Anatomy* **227**
- [10] Katsimbri P 2017 The biology of normal bone remodelling *European Journal of Cancer Care* **26**
- [11] Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira M B and Mano J F 2018 Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies *Biomaterials* **185** 240–75
- [12] Lin C Y and Kang J H 2021 Mechanical properties of compact bone defined by the stress-strain curve measured using uniaxial tensile test: A concise review and practical guide *Materials* **14**

- [13] Mirzaali M J, Schwiedrzik J J, Thaiwichai S, Best J P, Michler J, Zysset P K and Wolfram U 2016 Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly *Bone* **93** 196–211
- [14] Sabree I, Gough J E and Derby B 2015 Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions *Ceramics International* **41** 8425–32
- [15] Sensini A, Massafra G, Gotti C, Zucchelli A and Cristofolini L 2021 Tissue Engineering for the Insertions of Tendons and Ligaments: An Overview of Electrospun Biomaterials and Structures *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**
- [16] Matsuura M, Eckstein F, Lochmüller E M and Zysset P K 2008 The role of fabric in the quasi-static compressive mechanical properties of human trabecular bone from various anatomical locations *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **7** 27–42
- [17] Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho J C, Vaziri A and Nazarian A 2015 Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review *Journal of Biomechanical Engineering* **137**
- [18] Wu A-M, Bisignano C, James S L, Abady G G, Abedi A, Abu-Gharbieh E, Alhassan R K, Alipour V, Arabloo J, Asaad M, Asmare W N, Awedew A F, Banach M, Banerjee S K, Bijani A, Birhanu T T M, Bolla S R, Cámara L A, Chang J-C, Cho D Y, Chung M T, Couto R A S, Dai X, Dandona L, Dandona R, Farzadfar F, Filip I, Fischer F, Fomenkov A A, Gill T K, Gupta B, Haagsma J A, Haj-Mirzaian A, Hamidi S, Hay S I, Ilic I M, Ilic M D, Ivers R Q, Jürisson M, Kalhor R, Kanchan T, Kavetsky T, Khalilov R, Khan E A, Khan M, Kneib C J, Krishnamoorthy V, Kumar G A, Kumar N, Laloo R, Lasrado S, Lim S S, Liu Z, Manafi A, Manafi N, Menezes R G, Meretoja T J, Miazgowski B, Miller T R, Mohammad Y, Mohammadian-Hafshejani A, Mokdad A H, Murray C J L, Naderi M, Naimzada M D, Nayak V C, Nguyen C T, Nikbakhsh R, Olagunju A T, Otstavnov N, Otstavnov S S, Padubidri J R, Pereira J, Pham H Q, Pinheiro M, Polinder S, Pourchamani H, Rabiee N, Radfar A, Rahman M H U, Rawaf D L, Rawaf S, Saeb M R, Samy A M, Sanchez Riera L, Schwebel D C, Shahabi S, Shaikh M A, Soheili A, Tabarés-Seisdedos R, Tovani-Palone M R, Tran B X, Travillian R S, Valdez P R, Vasankari T J, Velazquez D Z, Venketasubramanian N, Vu G T, et al 2021 Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019 *The Lancet Healthy Longevity* **2** e580–92
- [19] Glotzbach J P, Wong V W, Gurtner G C and Longaker M T 2011 Regenerative Medicine *Current Problems in Surgery* **48** 148–212

- [20] Rony L, Lancigu R and Hubert L 2018 Intraosseous metal implants in orthopedics: A review *Morphologie* **102** 231–42
- [21] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A and Maffulli N 2014 Bone regenerative medicine: Classic options, novel strategies, and future directions *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **9**
- [22] Conzemius M and Swainson S 1999 Fracture fixation with screws and bone plates. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **29**
- [23] Albrektsson T and Johansson C 2001 Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration *European Spine Journal* **10** S96–101
- [24] Laurencin C, Khan Y and El-Amin S F 2006 Bone graft substitutes *Expert Review of Medical Devices* **3** 49–57
- [25] Greenwald A S, Boden S D, Goldberg V M, Khan Y, Laurencin C T and Rosier R N 2001 *Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications*
- [26] Hutmacher D W 2001 Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **12** 107–24
- [27] Park J Y, Park S H, Kim M G, Park S H, Yoo T H and Kim M S 2018 Biomimetic scaffolds for bone tissue engineering *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol 1064 (Springer New York LLC) pp 109–21
- [28] Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S and Selvamurugan N 2018 Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques *International Journal of Biological Macromolecules* **119** 1228–39
- [29] Abdulghani S and Mitchell G R 2019 Biomaterials for in situ tissue regeneration: A review *Biomolecules* **9**
- [30] Bisht B, Hope A, Mukherjee A and Paul M K 2021 Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft *Annals of Biomedical Engineering* **49** 1128–50
- [31] Augst A D, Kong H J and Mooney D J 2006 Alginate hydrogels as biomaterials *Macromolecular Bioscience* **6** 623–33
- [32] Bauer T W and Muschler G F *Bone Graft Materials* vol 371
- [33] Lv T, Zhou C, Li J, Huang S, Wen H, Meng Y and Jiang S 2018 New insight into the mechanism of enhanced crystallization of PLA in PLLA/PDLA mixture *Journal of Applied Polymer Science* **135**

- [34] Ju J, Peng X, Huang K, Li L, Liu X, Chitrakar C, Chang L, Gu Z and Kuang T 2019 High-performance porous PLLA-based scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation *Polymer (Guildf)* **180**
- [35] Quynh T M, Mitomo H, Nagasawa N, Wada Y, Yoshii F and Tamada M 2007 Properties of crosslinked polylactides (PLLA & PDLA) by radiation and its biodegradability *European Polymer Journal* **43** 1779–85
- [36] Kim H D, Amirthalingam S, Kim S L, Lee S S, Rangasamy J and Hwang N S 2017 Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering *Advanced Healthcare Materials* **6**
- [37] Karunakaran R, Ortgies S, Tamayol A, Bobaru F and Sealy M P 2020 Additive manufacturing of magnesium alloys *Bioactive Materials* **5** 44–54
- [38] Vey E, Rodger C, Booth J, Claybourn M, Miller A F and Saiani A 2011 Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies *Polymer Degradation and Stability* **96** 1882–9
- [39] Scaffaro R, Maio A and Nostro A 2020 Poly(lactic acid)/carvacrol-based materials: preparation, physicochemical properties, and antimicrobial activity *Applied Microbiology and Biotechnology* **104** 1823–35
- [40] McKeen L W 2012 Environmentally Friendly Polymers *Permeability Properties of Plastics and Elastomers* (Elsevier) pp 287–304
- [41] López-García J, Lehocký M, Humpolíček P and Sáva P 2014 HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation *Journal of Functional Biomaterials* **5** 43–57
- [42] Wang Y, Cai L-Q, Nugraha B, Gao Y and Leo H L 2014 Current Hydrogel Solutions for Repairing and Regeneration of Complex Tissues *Current Medicinal Chemistry* **21** 2480–96
- [43] Gao C, Peng S, Feng P and Shuai C 2017 Bone biomaterials and interactions with stem cells *Bone Research* **5**
- [44] Nikolova M P and Chavali M S 2019 Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review *Bioactive Materials* **4** 271–92
- [45] Zhang X Y, Fang G and Zhou J 2017 Additively manufactured scaffolds for bone tissue engineering and the prediction of their mechanical behavior: A review *Materials* **10**



- [46] Bahraminasab M 2020 Challenges on optimization of 3D-printed bone scaffolds *BioMedical Engineering Online* **19**
- [47] Taboas J M, Maddox R D, Krebsbach P H and Hollister S J 2003 *Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds* vol 24
- [48] Chen H, Han Q, Wang C, Liu Y, Chen B and Wang J 2020 Porous Scaffold Design for Additive Manufacturing in Orthopedics: A Review *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**
- [49] Deering J, Dowling K I, DiCecco L A, McLean G D, Yu B and Grandfield K 2021 Selective Voronoi tessellation as a method to design anisotropic and biomimetic implants *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **116**
- [50] Fantini M, Curto M and de Crescenzo F 2016 A method to design biomimetic scaffolds for bone tissue engineering based on Voronoi lattices *Virtual and Physical Prototyping* **11** 77–90
- [51] Zhao H, Han Y, Pan C, Yang D, Wang H, Wang T, Zeng X and Su P 2021 Design and mechanical properties verification of gradient voronoi scaffold for bone tissue engineering *Micromachines (Basel)* **12**
- [52] Wang G, Shen L, Zhao J, Liang H, Xie D, Tian Z and Wang C 2018 Design and Compressive Behavior of Controllable Irregular Porous Scaffolds: Based on Voronoi-Tessellation and for Additive Manufacturing *ACS Biomaterials Science and Engineering* **4** 719–27
- [53] Herath B, Suresh S, Downing D, Cometta S, Tino R, Castro N J, Leary M, Schmutz B, Wille M L and Huttmacher D W 2021 Mechanical and geometrical study of 3D printed Voronoi scaffold design for large bone defects *Materials and Design* **212**
- [54] Temple J P, Hutton D L, Hung B P, Huri P Y, Cook C A, Kondragunta R, Jia X and Grayson W L 2014 Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **102** 4317–25
- [55] Hedayati R, Sadighi M, Mohammadi-Aghdam M and Zadpoor A A 2016 Effect of mass multiple counting on the elastic properties of open-cell regular porous biomaterials *Materials and Design* **89** 9–20
- [56] Wauthle R, Vrancken B, Beynaerts B, Jorissen K, Schrooten J, Kruth J P and van Humbeeck J 2015 Effects of build orientation and heat treatment on the

microstructure and mechanical properties of selective laser melted Ti6Al4V lattice structures *Additive Manufacturing* **5** 77–84

- [57] Campoli G, Borleffs M S, Amin Yavari S, Wauthle R, Weinans H and Zadpoor A A 2013 Mechanical properties of open-cell metallic biomaterials manufactured using additive manufacturing *Materials and Design* **49** 957–65
- [58] Dhiman S, Singh M, Sidhu S S, Bahraminasab M, Pimenov D Y and Mikolajczyk T 2021 Cubic lattice structures of ti6al4v under compressive loading: Towards assessing the performance for hard tissue implants alternative *Materials* **14**
- [59] Gao H, Jin X, Yang J, Zhang D, Zhang S, Zhang F and Chen H 2021 Porous structure and compressive failure mechanism of additively manufactured cubic-lattice tantalum scaffolds *Materials Today Advances* **12**
- [60] Lu M, Xu S, Lei Z X, Lu D, Cao W, Huttula M, Hou C H, Du S H, Chen W, Dai S W, Li H M and Jin D di 2019 Application of a novel porous tantalum implant in rabbit anterior lumbar spine fusion model: In vitro and in vivo experiments *Chinese Medical Journal* **132** 51–62
- [61] Jiang C P, Wibisono A T and Pasang T 2021 Selective laser melting of stainless steel 316L with face-centered-cubic-based lattice structures to produce rib implants *Materials* **14**
- [62] Gatto M L, Furlani M, Giuliani A, Bloise N, Fassina L, Visai L and Mengucci P 2021 Biomechanical performances of PCL/HA micro- and macro-porous lattice scaffolds fabricated via laser powder bed fusion for bone tissue engineering *Materials Science and Engineering C* **128**
- [63] Li Y, Jahr H, Lietaert K, Pavanram P, Yilmaz A, Fockaert L I, Leeftang M A, Pouran B, Gonzalez-Garcia Y, Weinans H, Mol J M C, Zhou J and Zadpoor A A 2018 Additively manufactured biodegradable porous iron *Acta Biomaterialia* **77** 380–93
- [64] Zhang B, Pei X, Zhou C, Fan Y, Jiang Q, Ronca A, D’Amora U, Chen Y, Li H, Sun Y and Zhang X 2018 The biomimetic design and 3D printing of customized mechanical properties porous Ti6Al4V scaffold for load-bearing bone reconstruction *Materials and Design* **152** 30–9
- [65] Jetté B, Brailovski V, Dumas M, Simoneau C and Terriault P 2018 Femoral stem incorporating a diamond cubic lattice structure: Design, manufacture and testing *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **77** 58–72

- [66] Liu F, Zhang D Z, Zhang P, Zhao M and Jafar S 2018 Mechanical properties of optimized diamond lattice structure for bone scaffolds fabricated via selective laser melting *Materials* **11**
- [67] Kanwar S and Vijayavenkataraman S 2021 Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review *Bioprinting* **24**
- [68] Gu Y, Sun Y, Shujaat S, Braem A, Politis C and Jacobs R 2022 3D-printed porous Ti6Al4V scaffolds for long bone repair in animal models: a systematic review *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **17**
- [69] Červinek O, Werner B, Koutný D, Vaverka O, Pantělejev L and Paloušek D 2021 Computational approaches of quasi-static compression loading of SS316L lattice structures made by selective laser melting *Materials* **14**
- [70] Feng Q, Tang Q, Liu Z, Liu Y and Setchi R 2018 An investigation of the mechanical properties of metallic lattice structures fabricated using selective laser melting *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture* **232** 1719–30
- [71] Gümrük R, Mines R A W and Karadeniz S 2013 Static mechanical behaviours of stainless steel micro-lattice structures under different loading conditions *Materials Science and Engineering A* **586** 392–406
- [72] Huo P, Zhao Z, Bai P, Yuan X, Wang Q, Zhao R, Zhang L, Du W, Han B and Wang Y 2021 Deformation evolution and fracture mechanism of porous TC4 alloy scaffolds fabricated using selective laser melting under uniaxial compression *Journal of Alloys and Compounds* **861**
- [73] Hacisalihoğlu İ, Yildiz F and Çelik A 2021 Experimental and Numerical Investigation of Mechanical Properties of Different Lattice Structures Manufactured from Medical Titanium Alloy by Using Laser Beam-Powder Bed Fusion *Journal of Materials Engineering and Performance* **30** 5466–76
- [74] Chowdhury S, Anand A, Singh A and Pal B 2021 Evaluation of mechanical properties of Ti-25Nb BCC porous cell structure and their association with structure porosity: A combined finite element analysis and analytical approach for orthopedic application *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* **235** 827–37
- [75] Gatto M L, Groppo R, Bloise N, Fassina L, Visai L, Galati M, Iuliano L and Mengucci P 2021 Topological, mechanical and biological properties of Ti6Al4V scaffolds for bone tissue regeneration fabricated with reused powders via electron beam melting *Materials* **14** 1–20

- [76] Horn T J, Harrysson O L A, Marcellin-Little D J, West H A, Lascelles B D X and Aman R 2014 Flexural properties of Ti6Al4V rhombic dodecahedron open cellular structures fabricated with electron beam melting *Additive Manufacturing* **1** 2–11
- [77] Epasto G, Palomba ; G, D'andrea ; D, di Bella ; S, Mineo ; R, Guglielmino ; E and Traina ; F 2018 *ScienceDirect Experimental investigation of rhombic dodecahedron micro-lattice structures manufactured by Electron Beam Melting-review under responsibility of 1st International Conference on Materials, Mimicking, Manufacturing from and for Bio Application (BioM&M)*
- [78] Xiao L, Song W, Wang C, Liu H, Tang H and Wang J 2015 Mechanical behavior of open-cell rhombic dodecahedron Ti-6Al-4V lattice structure *Materials Science and Engineering A* **640** 375–84
- [79] Bagheri A, Buj-Corral I, Ferrer M, Pastor M M and Roure F 2018 Determination of the elasticity modulus of 3D printed octet-truss structures for use in porous prosthesis implants *Materials* **11**
- [80] Ferrigno A, di Caprio F, Borrelli R, Auricchio F and Vigliotti A 2019 The mechanical strength of Ti-6Al-4V columns with regular octet microstructure manufactured by electron beam melting *Materialia (Oxf)* **5**
- [81] Ling C, Cernicchi A, Gilchrist M D and Cardiff P 2019 Mechanical behaviour of additively-manufactured polymeric octet-truss lattice structures under quasi-static and dynamic compressive loading *Materials and Design* **162** 106–18
- [82] Arabnejad S, Burnett Johnston R, Pura J A, Singh B, Tanzer M and Pasini D 2016 High-strength porous biomaterials for bone replacement: A strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints *Acta Biomaterialia* **30** 345–56
- [83] Li J, Chen D, Luan H, Yan W and Fan Y 2017 MECHANICAL PERFORMANCE of POROUS IMPLANT with DIFFERENT UNIT CELLS *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* **17**
- [84] Cheah Y K, Azman A H and Bajuri M Y 2022 Finite-element Analysis of Load-bearing Hip Implant Design for Additive Manufacturing *Journal of Failure Analysis and Prevention*
- [85] Hedayati R, Sadighi M, Mohammadi-Aghdam M and Zadpoor A A 2016 Mechanical properties of regular porous biomaterials made from truncated cube repeating unit cells: Analytical solutions and computational models *Materials Science and Engineering C* **60** 163–83

- [86] Zadpoor A A and Hedayati R 2016 Analytical relationships for prediction of the mechanical properties of additively manufactured porous biomaterials *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **104** 3164–74
- [87] Ahmadi S M, Yavari S A, Wauthle R, Pouran B, Schrooten J, Weinans H and Zadpoor A A 2015 Additively manufactured open-cell porous biomaterials made from six different space-filling unit cells: The mechanical and morphological properties *Materials* **8** 1871–96
- [88] Park K M, Min K S and Roh Y S 2022 Design Optimization of Lattice Structures under Compression: Study of Unit Cell Types and Cell Arrangements *Materials* **15**
- [89] Rodríguez-Montaña Ó L, Cortés-Rodríguez C J, Uva A E, Fiorentino M, Gattullo M, Monno G and Boccaccio A 2018 Comparison of the mechanobiological performance of bone tissue scaffolds based on different unit cell geometries *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **83** 28–45
- [90] Shi J, Zhu L, Li L, Li Z, Yang J and Wang X 2018 A TPMS-based method for modeling porous scaffolds for bionic bone tissue engineering *Scientific Reports* **8**
- [91] Liu F, Mao Z, Zhang P, Zhang D Z, Jiang J and Ma Z 2018 Functionally graded porous scaffolds in multiple patterns: New design method, physical and mechanical properties *Materials and Design* **160** 849–60
- [92] Ambu R and Morabito A E 2018 Porous scaffold design based on minimal surfaces: Development and assessment of variable architectures *Symmetry (Basel)* **10**
- [93] Castro A P G, Pires T, Santos J E, Gouveia B P and Fernandes P R 2019 Permeability versus design in TPMS scaffolds *Materials* **12**
- [94] Dong Z and Zhao X 2021 Application of TPMS structure in bone regeneration *Engineered Regeneration* **2** 154–62
- [95] Mishra A K, Chavan H and Kumar A 2021 Effect of material variation on the uniaxial compression behavior of FDM manufactured polymeric TPMS lattice materials *Materials Today: Proceedings* vol 46 (Elsevier Ltd) pp 7752–9
- [96] Liao B, Xia R F, Li W, Lu D and Jin Z M 2021 3D-Printed Ti6Al4V Scaffolds with Graded Triply Periodic Minimal Surface Structure for Bone Tissue Engineering *Journal of Materials Engineering and Performance* **30** 4993–5004

- [97] Vijayavenkataraman S, Kuan L Y and Lu W F 2020 3D-printed ceramic triply periodic minimal surface structures for design of functionally graded bone implants *Materials and Design* **191**
- [98] Senatov F S, Niaza K v., Salimon A I, Maksimkin A v. and Kaloshkin S D 2018 Architected UHMWPE simulating trabecular bone tissue *Materials Today Communications* **14** 124–7
- [99] Fantini M and Curto M 2018 Interactive design and manufacturing of a Voronoi-based biomimetic bone scaffold for morphological characterization *International Journal on Interactive Design and Manufacturing* **12** 585–96
- [100] Liang H, Yang Y, Xie D, Li L, Mao N, Wang C, Tian Z, Jiang Q and Shen L 2019 Trabecular-like Ti-6Al-4V scaffolds for orthopedic: fabrication by selective laser melting and in vitro biocompatibility *Journal of Materials Science and Technology* **35** 1284–97
- [101] Chao L, Jiao C, Liang H, Xie D, Shen L and Liu Z 2021 Analysis of Mechanical Properties and Permeability of Trabecular-Like Porous Scaffold by Additive Manufacturing *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**