

Diseño y fabricación rápida de geometrías biomiméticas fractales en materiales biocompatibles para aplicaciones en ingeniería de tejidos

A. Díaz Lantada, P. Lafont Morgado, P. Ortego García, J.M. Muñoz-Guijosa,
J.L. Muñoz Sanz, J. Echávarri Otero, E. Chacón Tanarro, E. de la Guerra Ochoa

*División de Ingeniería de Máquinas – Laboratorio de Desarrollo de Productos
Dpto. de Ingeniería Mecánica y Fabricación. Universidad Politécnica de Madrid
adiaz@etsii.upm.es*

Las tecnologías habitualmente empleadas para fabricar microdispositivos (“scaffolds” o andamios) para ingeniería de tejidos y estudios asociados, presentan dos limitaciones fundamentales: la dificultad de controlar la geometría final desde la etapa de diseño y los problemas asociados a la obtención de prototipos biocompatibles para pruebas. Las tecnologías de fabricación aditiva aportan solución al primero de dichos problemas, al fabricar siguiendo la geometría disponible en archivos CAD 3D. Sin embargo la mayoría de dichas tecnologías aditivas emplean polímeros fotosensibles (resinas epoxi, resinas acrílicas) que resultan tóxicos y no permiten su empleo para tareas de crecimiento y reproducción celular.

Por otro lado, los programas de diseño asistido por computador están orientados al diseño de geometrías suaves, típicas de la industria aeronáutica o de la automoción, que no permiten enfoques biomiméticos, ni diseños que permitan imitar de forma adecuada la complejidad de las superficies biológicas, sobre las que las células presentan un comportamiento óptimo. Para conseguir mimetizar la morfología de los organismos vivos resulta interesante el empleo de texturas y geometrías fractales, por lo que proponemos aquí un proceso de diseño que permite su empleo en programas de diseño asistido por computador.

El presente estudio recoge, tanto el proceso de diseño asistido por computador de diferentes geometrías fractales y microsistemas basados en ellas, como la fabricación aditiva de las mismas por fotopolimerización capa a capa. Se incluye también la obtención de réplicas de dichas geometrías y microsistemas mediante copiado rápido de formas y procesos sol-gel, con la intención de obtener prototipos en materiales biocompatibles, en lo que constituye una novedosa propuesta alternativa para diseñar y fabricar prototipos de microdispositivos con múltiples aplicaciones en ingeniería de tejidos también analizadas.

1. INTRODUCCIÓN: FRACTALES Y DISEÑO BIOMIMÉTICO

Los progresivos avances en el campo de los polímeros biodegradables, en combinación con el desarrollo de tecnologías de fabricación rápida cada vez más versátiles, han hecho que a día de hoy puedan obtenerse substratos o andamios (“scaffolds”), sobre los que se adhieren células vivas con factores de crecimiento, que se multiplican hasta cubrir el substrato. Una vez llegado a este punto todo el conjunto (substrato + recubrimiento) se implanta en zonas dañadas del organismo o bien se utiliza para estudios biológicos *in vitro*. Tras el implante las células se acomodan a su entorno y reproducen las funciones del tejido circundante, mientras que el substrato se reabsorbe progresivamente.

Sobre estos progresos se pretende seguir trabajando con la mirada puesta en la obtención de estructuras biológicas tridimensionales que algún día permitan la fabricación aditiva de órganos humanos. De hecho las tecnologías de imagen médica, las herramientas CAD de diseño por computador, las tecnologías de fabricación rápida y de microfabricación y los avances en ciencia de materiales han potenciado enormemente la industria de los dispositivos médicos y hacen que ahora

sea el momento adecuado para completar estas actuaciones con progresos en los sectores de la Ingeniería de Tejidos y la denominada “Biofabricación”.

En la actualidad, ciertas soluciones para ingeniería de tejidos típicamente utilizan andamios y microsistemas diseñados mediante herramientas CAD convencionales, por lo que sus geometrías suelen resultar demasiado sencillas (placas con ranuras o pequeños pozos, estructuras de cilindros apilados...) y no permiten simular la morfología de los tejidos biológicos de forma precisa, lo que limita el potencial de crecimiento celular. Esto es así porque los paquetes CAD históricamente han estado ligados al diseño de geometrías “suaves” para la industria aeronáutica y de la automoción, por lo que imitar la complejidad de los tejidos y estructuras corporales resulta complejo.

Parece adecuado complementar dichos procesos de diseño con la incorporación de nuevas geometrías orientadas a obtener dichos diseños multiescala o irregulares y el campo de la “Geometría Fractal” puede aportar soluciones destacables. El término “fractal”, del latín *fractus*, que significa irregular o fracturado fue definido por Benoît Mandelbrot [1], para referirse a geometrías demasiado complejas, como para ser definidas en los términos euclídeos habituales, por la incorporación de propiedades como la auto-similitud y definiciones normalmente recursivas o mediante ecuaciones no diferenciables en ningún punto.

Desde las primeras investigaciones en el campo de la Geometría Fractal, quedó claro que resultaba adecuada para describir la complejidad de objetos naturales [3-5]. Si bien los fractales son infinitamente complejos, fractales “aproximados” se encuentran fácilmente en la Naturaleza, que habitualmente presenta estructuras autosimilares, si bien en una escala finita. Mediante un truncamiento adecuado de definiciones recursivas de fractales, se pueden modelar adecuadamente objetos y fenómenos naturales como nubes, copos de nieve, árboles, montañas... [1-2].

Detallamos en este trabajo el desarrollo de un tipo especial de andamios para ingeniería de tejidos o “scaffolds” y de microsistemas de apoyo, basados en el empleo de geometrías fractales, que ayudan a simular las características de los organismos biológicos y potencian enormemente el crecimiento celular. Nuestros procesos de diseño biomimético asistido por computador y de fabricación aditiva de formas complejas, adecuadamente protegidos bajo patentes, permiten superar limitaciones geométricas y mejorar por tanto los resultados de los “scaffolds” actualmente disponibles en el mercado [6-9].

Con productos basados en este planteamiento, se puede dar respuesta a múltiples patologías, de origen traumático o degenerativo, mediante el crecimiento artificial de tejidos adecuados a partir de células madre; además de realizar estudios comparativos *in vitro*, farmacológicos y oncológicos, que permiten evaluar la respuesta de diferentes células y tejidos ante distintos estímulos físico-químicos. El empleo de microtexturas controladas, en base al empleo de modelos fractales, puede ser determinante para optimizar y orientar dicho crecimiento.

Se detallan en las próximas secciones el proceso de diseño asistido por computador, de fabricación mediante fotopolimerización por capas (tecnologías aditivas o de “rapid prototyping”), así como la obtención final de dispositivos empleando biomateriales, gracias a procesos de copiado rápido de formas, procesos sol-gel y colada en moldes de silicona. Se incluyen también ciertas consideraciones de cara a futuras investigaciones, junto a una breve discusión sobre la viabilidad de la propuesta.

2. DISEÑO DE BIODISPOSITIVOS BASADOS EN GEOMETRÍAS FRACTALES

Los modelos fractales elegidos como apoyo a los diseños presentados aquí son modelos de superficies fractales fraccionales Brownianas, con los que se pueden controlar desde la etapa de diseño aspectos como la rugosidad, relación superficie volumen, grado de autosimilitud, todo ello integrado en el concepto de dimensión fractal [1-2].

Existen muchas definiciones para la dimensión fractal y una explicación detallada queda fuera del ámbito de este trabajo, pero, en esencia, dicha dimensión fractal presenta valores reales positivos (no necesariamente enteros) y normalmente excede a la dimensión topológica del objeto fractal. Por ejemplo, las superficies fractales, por sus irregularidades y apariencia fracturada (vistas de cerca) son más que bidimensionales, mientras que su apariencia global (vistas de lejos) es bidimensional. También los caminos aleatorios y fractales pueden terminar cubriendo completamente el plano sobre el que se dibujan, si su longitud es suficientemente larga, llegando incluso a ser bidimensionales.

Para materializar los diseños fractales se pueden emplear ecuaciones concretas, como mostramos en este estudio, que permiten representar la altura “z” en función de las coordenadas “x” e “y” del plano horizontal “XY”. Dichas ecuaciones permiten la obtención de matrices de alturas asociadas a una cuadrícula, según el grado de detalle deseado (y deseable, en función de las capacidades de nuestros computadores y de la precisión de los equipos de fabricación disponibles), que contienen la información necesaria para su posterior empleo en programas de diseño (y fabricación) asistido por computador, según se detalla más adelante.

El proceso se basa en la obtención de las matrices de alturas Z(x,y) mediante sumatorios de infinitos términos con ciertas componentes aleatorias, si bien a la hora de realizar los cálculos y obtener la información asociada a las matrices de alturas resulta suficiente con extender los sumatorios de las expresiones siguientes hasta valores de n = 100 o menores. Detallamos a continuación el empleo de una expresión, basada en modelos fractales fraccionales Brownianos, que nos permite obtener los diseños buscados:

$$z(x, y) = z_0(x, y) + m \cdot \sum_{k=1}^{\infty} C_k \cdot \lambda^{-\alpha k} \cdot \sin(\lambda^k [x \cdot \cos(B_k) + y \cdot \sin(B_k) + A_k])$$

En dicha expresión α , λ , m actúan como parámetros de control y la dimensión fractal viene dada por $3 - \alpha$, en estos modelos y su impacto se puede observar en la Figura 1, mientras que A_k y B_k son términos aleatorios basados en distribuciones normales. La altura de las irregularidades puede controlarse adicionalmente en base a modificaciones en el parámetro “ λ ”. Los términos aleatorios ayudan al biomimetismo puesto que las estructuras corporales presentan siempre ciertas irregularidades.

Una vez obtenida la matriz de alturas, que proporciona las coordenadas (x, y, z) de los puntos utilizados para definir la superficie destinada a acoger a las células y tejidos para su crecimiento, se pueden utilizar conversores de formato que permiten pasar desde la información incluida en matrices que definen superficies de objetos, hasta un formato típico .stl, entre otros válidos, que sea reconocible por la mayoría de máquinas de fabricación automatizada y fabricación aditiva y utilizable también por numerosos programas de diseño asistido por computador “CAD”.

Tras la obtención de la superficie fractal buscada en un formato reconocible por herramientas “CAD” se pueden realizar tareas adicionales de diseño y todo tipo de operaciones basadas en dicha geometría (extrusiones para obtener un espesor que aporte consistencia, simetrías para obtener substratos con geometría fractal en caras opuestas, vaciados, operaciones booleanas), con lo que se aporta versatilidad a los diseños de substratos realizables y se controla mejor su adaptabilidad al tipo de células y tejidos, cuyo crecimiento se quiera promocionar. La Figura 2 muestra los ejemplos de geometrías CAD 3D objeto de este estudio, con detalles obtenidos a partir de modelos fractales.

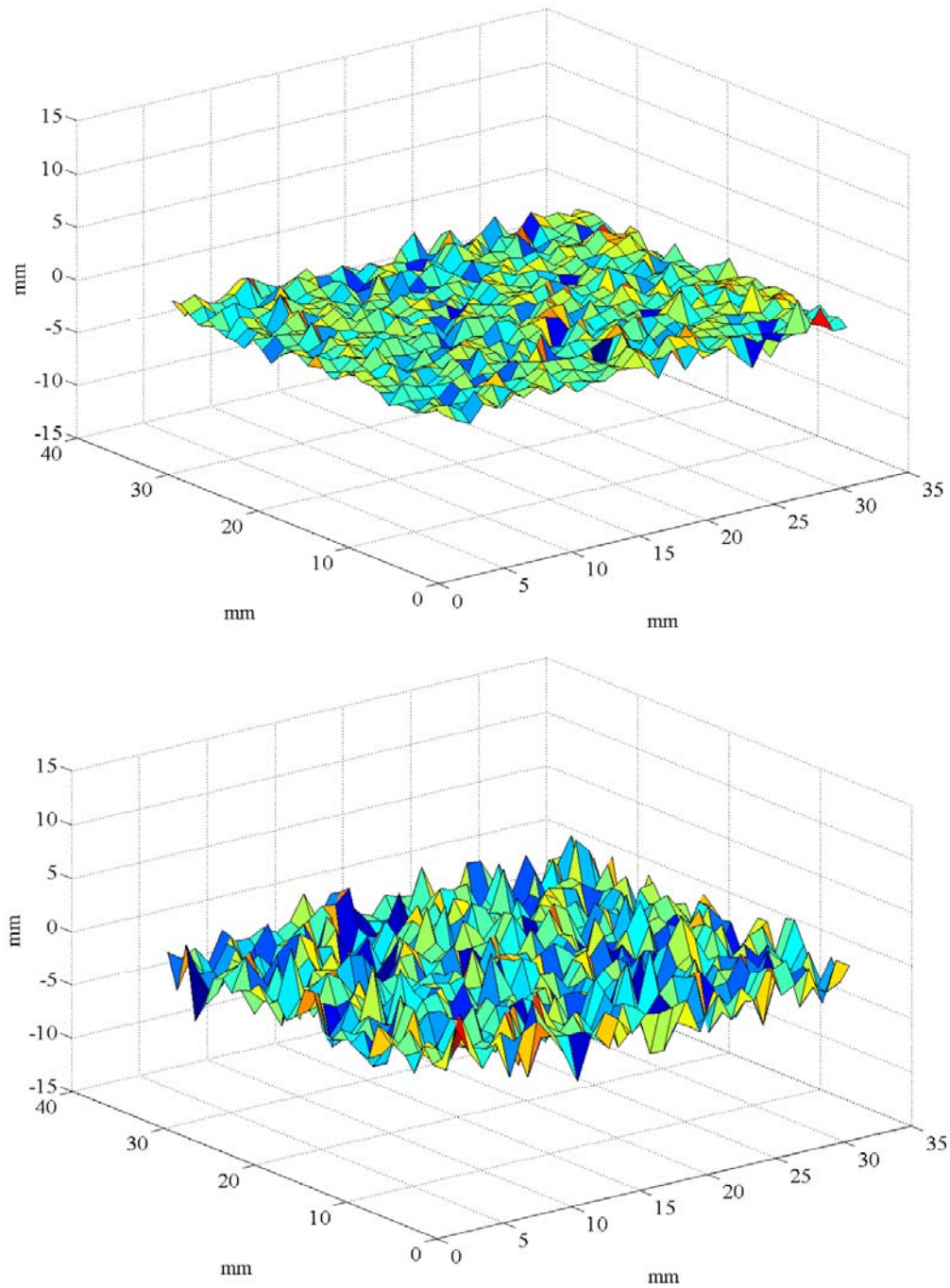


Figura 1. Superficies fractales fraccionales Brownianas: Efecto de la dimensión fractal. (Figura superior – dimensión fractal = 2,2; figura inferior – dimensión fractal = 2,6).

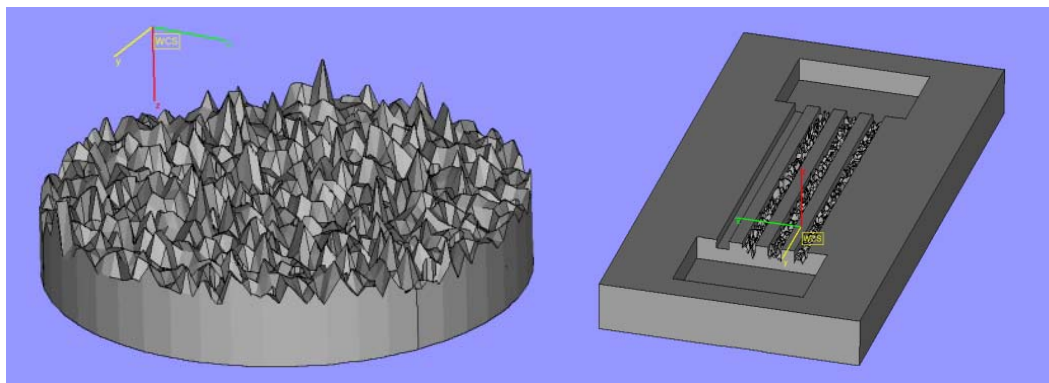


Figura 2. Obtención de modelos CAD de andamio fractal para ingeniería de tejidos y de microsistema con canales fractales para estudios de motilidad celular.

Una vez detallado el proceso de diseño, la fabricación automatizada de estas geometrías complejas se explica en la siguiente sección.

3. FABRICACIÓN ADITIVA DE BIODISPOSITIVOS Y MICROSISTEMAS FRACTALES

A partir del diseño “CAD” se pueden utilizar diversas tecnologías de fabricación, tanto subtractiva como aditiva, con movimiento automatizado en función de la geometría diseñada. Así por ejemplo se puede recurrir al empleo de centros de mecanizado por control numérico en los que una herramienta realiza pasadas progresivas sobre un bloque de material, para llegar al substrato diseñado. Dentro de las tecnologías de fabricación por arranque de material que pueden ser de utilidad en la obtención de este tipo de substratos cabe citar también el micromecanizado por arranque de viruta, el micromecanizado láser y otras tecnologías de ablación láser.

También se puede recurrir al empleo de tecnologías de fabricación aditiva, a veces también denominadas de impresión 3D, de fabricación rápida o de “rapid manufacturing”, con las que las geometrías alcanzables son aún más complejas al fabricar las piezas de forma aditiva o “capa a capa”, con lo que se pueden conseguir ciertas estructuras huecas o porosas imposibles de obtener por mecanizado convencional, así como geometrías fractales.

La Figura 3 muestra el empleo de fotopolimerización capa a capa para obtención de los prototipos de andamio fractal para ingeniería de tejidos y de microsistema con canales fractales en resina acrílica. Su principal problema radica en que el material resulta tóxico para posteriores estudio ex vivo con células, por lo que es necesario recurrir a procesos de copiado rápido de formas para obtención de moldes de PDMS, en los que luego colar otros materiales adecuados o directamente copiar las geometrías empleando biomateriales, según detalla la siguiente sección.

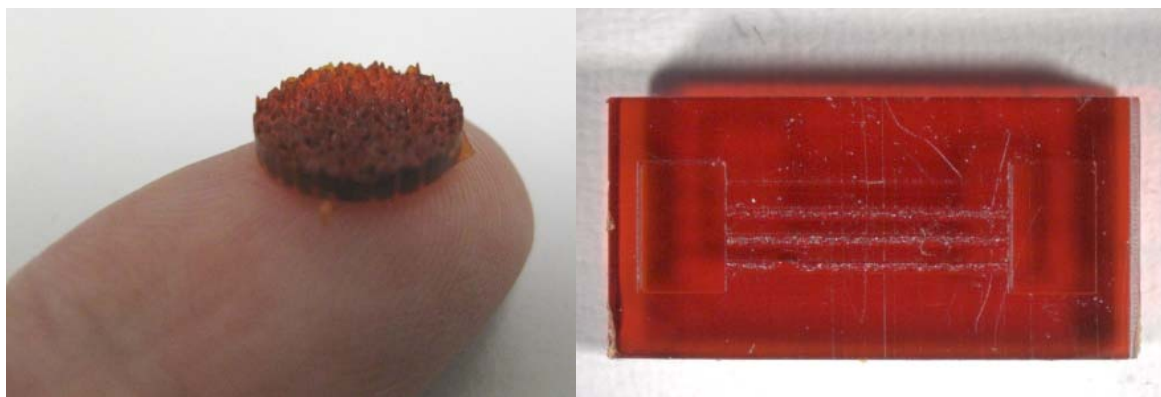


Figura 3. Prototipo de andamio fractal para ingeniería de tejidos y de microsistema con canales fractales.

4. OBTENCIÓN DE RÉPLICAS EN BIOMATERIALES

A partir de los modelos iniciales se pueden obtener moldes rápidos por copiado de formas, en los que realizar posteriormente preseries de prototipos y series cortas, por colada de múltiples materiales para poder comparar las propiedades de diferentes sustratos o para obtener sustratos para diferentes aplicaciones. En estos moldes rápidos se puede colar también cera para posterior obtención de moldes cerámicos y colada a la cera perdida de metales de alto punto de fusión, para la obtención de sustratos más robustos.

Esta opción resulta una alternativa más económica que la opción de fabricar moldes de inyección convencionales, por procesos de electroerosión o de arranque de viruta, que lleven a la obtención de improntas con superficies fractales, en las que inyectar todo tipo de polímeros termoplásticos e incluso metales. Si bien más cara, por el elevado precio de los moldes de inyección, esta última opción es más adecuada de cara a la producción de series largas de sustratos para ingeniería de tejidos y crecimiento de células. Sin embargo de cara a tareas de investigación las opciones comentadas aquí resultan más adecuadas.

En aplicaciones específicas puede requerirse una porosidad adicional para un sustrato concreto y puede recurrirse a tecnologías especiales de inyección (de polímeros fundamentalmente) en moldes, como la inyección asistida por gas o la inyección asistida por fluidos supercríticos, con las que se obtienen piezas de baja densidad y elevada relación superficie/volumen capaz de promocionar y acelerar numerosas reacciones biológicas, necesarias para el crecimiento celular. También se pueden realizar coladas con agentes porógenos (sal, agua, cera...) que tras obtención de la pieza se eliminan por disolución o por calentamiento, obteniendo estructuras finales porosas. En todo caso se detallan unos ejemplos concretos a continuación de posibles alternativas.

La Figura 4 muestra la colada de cera de abeja en un molde de PDMS obtenido por copiado de formas sobre un bastidor en el que previamente se habían situado los modelos maestros obtenidos por fabricación aditiva, así como la réplica del micro sistema para estudio de motilidad celular finalmente obtenida. La Figura 5 muestra dicho bastidor, sobre el que se colocan los modelos maestros y la obtención de un biogel apto para posteriores pruebas, al que se llega tras proceso sol-gel empleando agar de la serie "Texturas" de Ferrán Adriá, comercializado por Sole-Graells. Dicho biogel se extrae del molde y se corta adecuadamente para disponer de las distintas réplicas para estudios posteriores.

También es posible recurrir a procesos de moldeo por compresión en caliente, con los que incluso acometer la fabricación en serie de réplicas sobre los modelos maestros. En nuestro caso hemos empleado policaprolactona (Mindsets Online) adquirida en forma de granza y que, tras calentamiento por encima de su transición vítrea sobre 60°C, puede moldearse de forma artesanal o en serie por compresión sobre los prototipos originales, obteniendo así prototipos como el de la Figura 6. Dicha policaprolactona es comúnmente utilizada en procesos asociados a la Ingeniería de Tejidos, como apoyo a tareas de crecimiento de células y estudios asociados.

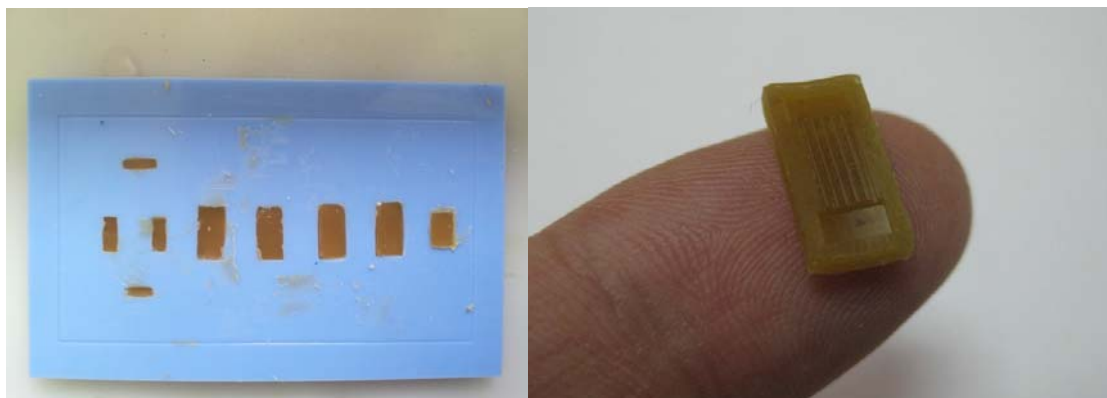


Figura 4. Réplicas obtenidas en cera de abeja por colado en moldes rápidos de PDMS.

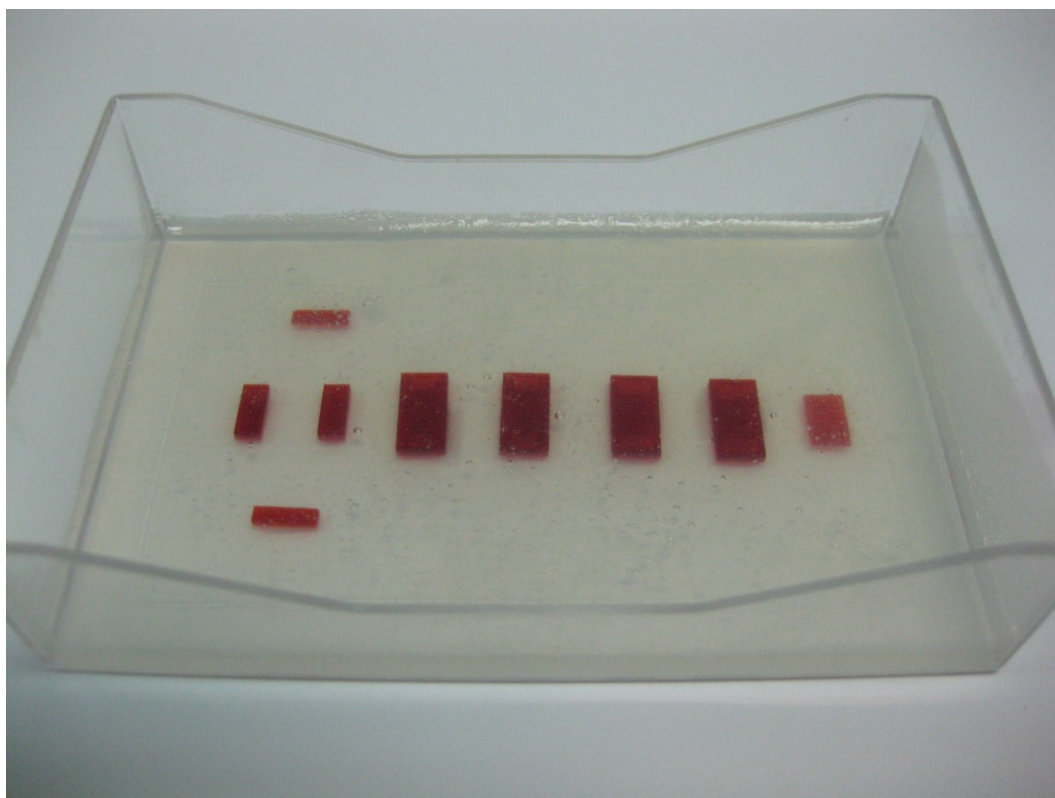


Figura 5. Copiado rápido de formas por procesos sol-gel empleando agar.



Figura 6. Réplicas obtenidas en policaprolactona por compresión en caliente.

5. CONCLUSIONES PRINCIPALES Y PROPUESTAS FUTURAS

El presente estudio ha recogido, tanto el proceso de diseño asistido por computador de diferentes geometrías fractales y microsistemas basados en ellas, como la fabricación aditiva de las mismas por foto-polimerización capa a capa. Se ha incluido también la obtención de réplicas de dichas geometrías y microsistemas, mediante copiado rápido de formas y procesos sol-gel, con la intención de obtener prototipos en materiales biocompatibles (PDMS, cera, agar, policaprolactona), en lo que constituye una novedosa propuesta alternativa para diseñar y fabricar prototipos de microdispositivos con múltiples aplicaciones en ingeniería de tejidos también analizadas.

Futuras pruebas *ex vivo* ayudarán a validar de forma adicional las ventajas de los diseños presentados y del empleo de texturas fractales, de cara a seleccionar las combinaciones de geometría-material más adecuadas para distintas aplicaciones y distintos tipos de tejidos objetivo.

El empleo de diferentes recubrimientos superficiales, por ejemplo aplicando tecnologías de deposición física o química de vapor (PVD y CVD), con lo que las características de contacto y de biocompatibilidad pueden adaptarse, de forma adicional, a la aplicación final y así potenciar el crecimiento de tejidos biológicamente estables, es también una interesante línea de continuación.

6. REFERENCIAS

- [1] B.B. Mandelbrot *The Fractal Geometry of Nature*, W.H. Freeman and Company, 1983.
- [2] K. Falconer *Fractal Geometry: Mathematical Foundations and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd., 2003.
- [3] M.A. Tsyganov, I.B. Kresteva, G.V. Aslanidi, K.B. Aslanidi, A.R. Deev, G.R. Ivanitsky *The Mechanism of Fractal-Like Structure Formation by Bacterial Populations*, Journal of Biological Physics, 25(2), 165-176, 1999
- [4] D.W. Lin, S. Johnson, C. Hunt *Modeling Liver Physiology: Combining Fractals, Imaging and Animation*, Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS, San Francisco CA USA, 1-5, 3120-3123, 2004.
- [5] S. Longoni, M. Sartori *Fractal geometry of nature (bone) may inspire medical devices shape*, Nature Proceedings (in press), 3 Junio 2010 (online).
- [6] A. Díaz Lantada *et al.* *Design and rapid prototyping of DLC-coated fractal surfaces for tissue engineering*, Journal of Physics – Conference Series, 252 (2010), 012003.
- [7] A. Díaz Lantada *et al.* *Tissue engineering using novel rapid prototyped diamond-like carbon coated scaffolds*, Plasma Processes and Polymers, 3 (2012), 290-307.
- [8] A. Díaz Lantada *et al.* *Substrato cuasibidimensional para crecimiento de células y tejidos y método de obtención del mismo*, Oficina Española de Patentes y Marcas, P201030957.
- [9] A. Díaz Lantada *et al.* *Soporte tridimensional para producción artificial de órganos y otras estructuras del organismo humano y método de obtención del mismo*, Oficina Española de Patentes y Marcas, P201030956.