



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**“MODELLAZIONE GEOMETRICA E ANALISI
MICROTOMOGRAFICA DI UNA GRIGLIA PERSONALIZZATA
BIORIASSORBIBILE PER LA RIGENERAZIONE OSSEA NEL
SETTORE ODONTOIATRICO”**

Relatore: Prof. Savio Gianpaolo

**Laureando: Carminati Lorenzo
Matricola n.: 2102368**

Correlatore: Prof. Sivoletta Stefano

ANNO ACCADEMICO 2025 – 2026

Data di laurea 08/07/2026

*I've lived many lives
I've died many times
But in the end
My path has lead me here
And when I saw the world for what it really was
I realized how beautiful it can be*

*Some people see the ugliness in this world, the disarray
I've choose to see the beauty
I've followed countless stories
But none have truly been mine
There is only one real end
I will write this one myself*

INDICE

ABSTRACT	8
1. INTRODUZIONE	9
1.1. Dispositivi medici e biorassorbibilità	9
1.2. Tecniche di stampa 3D	10
1.2.1. Fused Deposition Modeling	10
1.2.2. Direct Ink Writing	11
1.2.3. Stereolitografia	12
1.2.4. Binder Jetting	12
1.2.5. Powder bed fusion	13
1.3. Materiali	14
1.3.1. Materiali polimerici	14
1.3.1.1. Materiali polimerici in letteratura	14
1.3.1.2. Materiali polimerici in commercio	17
1.3.2. Materiali bioceramici	20
1.3.2.1. Materiali ceramici bioattivi in letteratura	21
1.3.2.2. Materiali ceramici bioattivi in commercio	22
1.3.3. Materiali metallici	24
1.3.3.1. Materiali metallici in letteratura	24
1.3.3.2. Materiali metallici in commercio	25
1.4. Materiali stampati in 3D e odontoiatria	26
1.4.1. Osso alveolare e difetti ossei	26
1.4.2. Gabbie per la rigenerazione del tessuto osseo alveolare in commercio	28
1.4.3. Auxeticità	29
1.5. Scopo della tesi	33
2. MATERIALI E METODI: metodologia di analisi delle μ CT	36
2.1. Microtomografie e scaffold sui campioni murini	36
2.2. Gaussian Mixture Model	37
2.3. Procedimento per l'analisi delle μ CT	40
2.3.1. Allineamento tra μ CT e mesh ROI	41
2.3.2. Estrazione dei valori di HU	47
2.3.3. GMM su Matlab	48
2.3.4. Calcolo delle probabilità a posteriori	50
2.3.5. Creazione dei segmenti volumetrici su 3D Slicer	50
3. MATERIALI E METODI: protocollo di modellazione di una gabbia paziente specifica per la rigenerazione ossea	52
3.1. Sviluppo di un modello anatomico del difetto	52
3.2. Creazione della mesh di partenza per la gabbia	54

3.2.1. Primo approccio	54
3.2.2. Secondo approccio	56
3.3. Realizzazione della gabbia tridimensionale	58
4. RISULTATI E DISCUSSIONI	60
5. CONCLUSIONI.....	77
6. APPENDICI.....	80
6.A. Appendice A – Codici per 3D Slicer.....	80
6.A.1. Codice per estrazione del volume ROI.....	80
6.A.2.Codice per l’acquisizione dei valori di HU	82
6.A.3. Codice per la creazione dei segmenti volumetrici per ogni gaussiana	83
6.B. Appendice B – Codici per Matlab	87
6.B.1. Codice per lo sviluppo della GMM	87
6.B.2. Codice per il calcolo delle probabilità a posteriori	90
7. GUIDA PER LA REALIZZAZIONE IN PROPRIO DEL LAVORO: metodologia di analisi delle μ CT	93
7.1. Individuazione dei punti su 3D Slicer	93
7.2. Allineamento su Rhinoceros 3D	95
7.3. Verifica su 3D Slicer ed eventuali correzioni	97
7.4. Estrazione dei valori di HU su 3D Slicer	99
7.5. GMM su Matlab.....	100
7.6. Creazione dei segmenti volumetrici su 3D Slicer e analisi statistica	102
8. GUIDA PER LA REALIZZAZIONE IN PROPRIO DEL LAVORO: protocollo di modellazione di una gabbia paziente specifica per la rigenerazione ossea.....	104
8.1. Lavorazioni delle CT su 3D Slicer	104
8.2. Modellazione della gabbia	107
8.2.1. Primo metodo	107
8.2.2. Secondo metodo	112
8.3. Rhinoceros 3D.....	117
8.3.1. Sequenza di operazioni del workflow su Grasshopper.....	119
8.3.2. Fase conclusiva su Rhinoceros 3D	123
9. BIBLIOGRAFIA.....	125
10. RINGRAZIAMENTI	131

ABSTRACT

Il campo della medicina odontoiatrica fa spesso uso di dispositivi per il trattamento di difetti ossei alveolari complessi. Tra questi troviamo le griglie personalizzate prodotte principalmente in titanio per ottenere una combinazione di proprietà meccaniche e biologiche idonee al loro utilizzo. La fabbricazione in titanio dello scaffold presenta però il difetto di dover essere rimossa chirurgicamente o andare incontro a rigetto. Da ciò nasce la necessità di sostituire tale materiale con uno più stabile, forabile o riassorbibile, studiandone dei nuovi. Gli obiettivi del presente studio di tesi sono pertanto quelli di valutare l'impiego di nuovi materiali bioriassorbibili, attraverso l'analisi delle micro CT di scaffold applicati a cavie, e di sviluppare approcci di modellazione geometrica degli scaffold paziente specifici.

1. INTRODUZIONE

1.1. Dispositivi medici e biorisorbibilità

La ricostruzione di difetti ossei rappresenta ad oggi uno dei trattamenti clinici più studiati dalle ricerche scientifiche. Le tecniche tradizionali di innesti ossei prevedono l'utilizzo di tessuti autologhi od omologhi con limitazioni riguardanti la ridotta disponibilità di tessuto, rischio di rigetto, sviluppo di infezioni e aumento della durata dell'intervento chirurgico¹. Da tale considerazione, le ricerche scientifiche si stanno orientando verso l'utilizzo di materiali artificiali come sostituti dei trapianti tradizionali.

Gli scaffold impiantabili possono essere classificati in due grandi insiemi: biorisorbibili e non biorisorbibili. I primi comprendono quei materiali che, una volta impiantati, vengono degradati e riassorbiti dall'organismo. I secondi, invece, comprendono quei materiali che l'organismo non riesce a degradare, pur essendo impiantabili, e che pertanto sono permanenti o devono essere rimossi². Nel caso in cui gli innesti siano permanenti, vi è la possibilità di insorgenza di problematiche legate a reazioni da corpo estraneo, le quali inducono processi multifattoriali di adsorbimento proteico superficiale, infiammazione acuta con intervento di leucociti, infiammazione cronica indotta dall'azione di macrofagi e incapsulamento del corpo estraneo con tessuto neofibrotico. Questi processi comportano deformazione del tessuto, dolore e malfunzionamento dell'impianto, il quale necessita di essere rimosso³ (Fig.1).

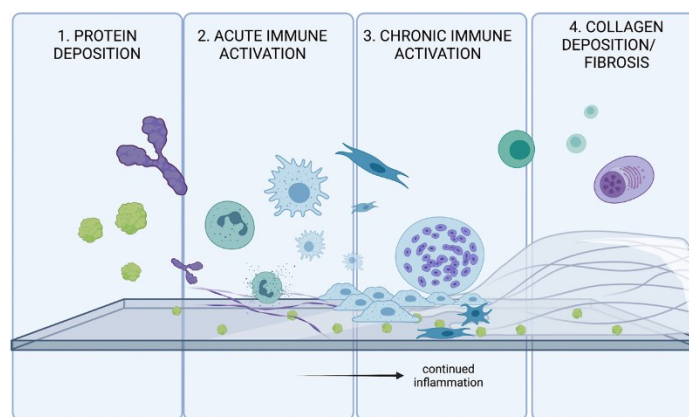


Figura 1: Le quattro fasi della reazione da corpo estraneo: adsorbimento proteico, infiammazione acuta, infiammazione cronica e incapsulamento fibrotico³

Qualora il materiale invece venga impiantato e tenuto in ambiente fisiologico solo per un periodo limitato, sussiste la necessità di un ulteriore intervento chirurgico di estrazione, in quanto non biorisorbibile². Date le seguenti premesse, le attenzioni scientifiche si

concentrano sui materiali biorassorbibili che permettono un sostegno nel periodo di osteogenesi ed angiogenesi, finché il materiale impiantato non va incontro a completa degradazione e assorbimento.

1.2. Tecniche di stampa 3D

All'interno di questo contesto, la modellazione geometrica in ambiente CAD 3D e le tecnologie additive permettono di progettare e realizzare scaffold con caratteristiche strutturali molto vicine a quelle del tessuto osseo realizzando strutture con porosità e morfologia dei pori ben definita⁴. La possibilità di definire le micro e macroporosità consente di creare strutture che emulano la componente corticale e spugnosa dell'osso⁴. Inoltre, la stampa 3D agevola la creazione di impianti personalizzati e specifici ai casi clinici in quanto fornisce maggiore precisione e adattamento al sito ricevente rispetto alle tecniche tradizionali sottrattive⁴. In questo ambito, le tecnologie di stampa 3D di maggiore interesse sono *Fused Deposition Modeling*, *Direct Ink Writing*, *Stereolitografia*, *Binder Jetting* e *Powder Bed Fusion*.

1.2.1. Fused Deposition Modeling

La *Fused Deposition Modeling* FDM (Fig.2) si basa sull'estrusione di filamenti termoplastici strato per strato, in contrapposizione alle tecnologie sottrattive⁴. La stampante lavora attraverso l'utilizzo di due materiali diversi: uno per creare la parte desiderata e l'altro per realizzare i supporti⁴. I due materiali termoplastici vengono fusi ad alte temperature per permettere l'estrusione attraverso due teste di fuoriuscita del liquido. I materiali vengono poi solidificati subito dopo la deposizione e si fondono con lo strato sottostante⁴.

Il macchinario lavora su tre dimensioni, di conseguenza presenta un motore per controllare ciascun movimento lungo ogni asse. Alla fine del processo, la stampa viene prelevata e vengono sottratti i residui dei supporti⁴.

La FDM è molto diffusa grazie alla semplicità di processo, ai costi contenuti e alla vasta gamma di materiali che può lavorare⁴.

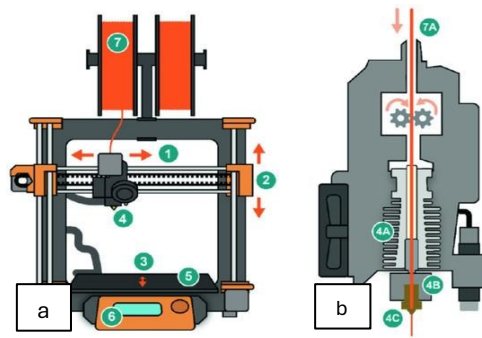


Figura 2: Diagramma schematico della tecnologia di stampa 3D FDM. lintera struttura delle tipiche stampanti FDM (a); dettagli dell'ugello di stampa(b).⁴

1.2.2. Direct Ink Writing

La *Direct Ink Writing* è una tecnologia di stampa additiva per materiali ceramici che realizza componenti mediante la deposizione controllata, strato su strato, di filamenti di sospensione ceramica, la cui sovrapposizione progressiva permette di ottenere la geometria finale del manufatto⁵. I sistemi DIW possono essere distinti in tre categorie principali in base al loro funzionamento⁵. Nei sistemi ad azione meccanica, la pasta ceramica viene estrusa mediante l'azione diretta di un motore che spinge un pistone. Nei sistemi ad azione pneumatica, l'estrusione avviene invece tramite aria compressa applicata al contenitore del materiale. Infine, nei sistemi a vite di estrusione, una vite senza fine trasporta e dosa continuamente la pasta verso l'ugello (Fig.3)⁵.

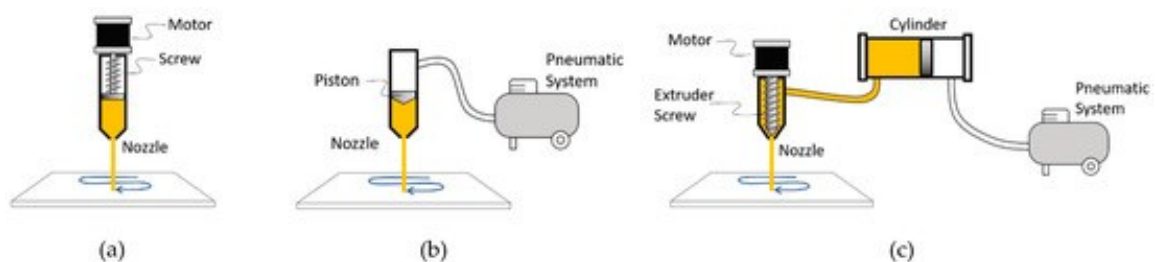


Figura 3: Tipologie di DIW: azione meccanica (a); azione pneumatica (b) e azione a vite di estrusione (c)⁵

Una delle sue principali caratteristiche è il funzionamento a temperatura ambiente, non richiedendo dunque sorgenti laser né radiazioni UV. Ne consegue una semplificazione dell'hardware e diminuzione dell'apporto energetico rispetto ad altre tecnologie. Inoltre, la DIW consente l'estrusione di paste ceramiche ad alta concentrazione, riduzione dei fenomeni di collasso della stampa e il controllo preciso di spaziatura e disposizione dei filamenti⁵.

Tuttavia, le prestazioni finali della stampa dipendono fortemente dalla configurazione del sistema di stampa, dalla pasta ceramica utilizzata e dai parametri di stampa. Per tale motivo, la DIW richiede una attenta ottimizzazione della reologia della pasta, dei parametri di stampa e del post processing⁵.

1.2.3. Stereolitografia

La *Stereolitografia* SLA è una tecnologia che rientra nei processi di *Vat Photopolymerization* (Fig.4)⁴. Essa polimerizza selettivamente resine fotosensibili liquide mediante l'utilizzo di una sorgente luminosa e ne permette la solidificazione strato per strato, seguendo la geometria del modello⁴. La SLA consente la fabbricazione di componenti in materiale polimerico grazie all'accuratezza della tecnologia e alla possibilità di riprodurre fedelmente il modello digitale⁴.

Una tipologia di resina fotosensibile utilizzabile è rappresentata dalle resine caricate con particelle ceramiche, come la silice⁶. Questi materiali sono costituiti da una sospensione di polveri ceramiche all'interno di una miscela di monomeri e oligomeri contenente un fotoiniziatore⁷. Grazie alla loro elevata malleabilità, tali resine possono essere impiegate in applicazioni nelle quali la precisione dimensionale del componente dopo la cottura non costituisce un requisito fondamentale.⁶

Durante il processo di stampa, una luce UV induce la polimerizzazione e l'indurimento dei monomeri/oligomeri, determinando la conseguente formazione di un *green body*, nel quale le particelle ceramiche vengono mantenute nella geometria desiderata dalla rete polimerica solidificata⁷. Successivamente, il *green body* deve essere sottoposto a una fase di *debinding* per la rimozione del legante, seguita da una fase di sinterizzazione ad alta temperatura necessaria per ottenere il componente ceramico finale⁷. Le temperature di processo dipendono sia dal sistema legante sia dal materiale strutturale utilizzato e devono essere accuratamente controllate per ridurre le tensioni termiche ed evitare la formazione di cricche⁷.

1.2.4. Binder Jetting

La *Binder Jetting* (Fig.4) è un processo di stampa che consiste nella deposizione di un legante su un letto di polvere al fine di formare le sezioni trasversali di un prodotto additivo. In successione, il sistema deposita uno strato ulteriore di polvere, il quale verrà fissato grazie all'applicazione del legante precedentemente estruso. Ad ogni strato formato, la stampa viene

sottoposta ad un processo di polimerizzazione tramite un aumento della temperatura. A fine processo, il *green body* deve essere sottoposto a post processing al fine di perfezionare e pulire la stampa⁴. La *Binder Jetting* è una tecnologia economica, versatile sul piano dei materiali utilizzati (ceramici, polimerici e metallici) e riduce al minimo le distorsioni legate alle elevate temperature. D'altro canto, i prodotti realizzati con questa tecnica di stampa additiva hanno densità basse a causa della maggiore dimensione delle particelle. Inoltre, le stampe necessitano di rifiniture manuali post processo a causa dei residui lasciati dai leganti⁴.

1.2.5. Powder bed fusion

Un'ulteriore tecnologia additiva è la *Powder Bed Fusion* (Fig.4) che comprende le tecnologie basate sull'utilizzo di laser, come la *Selective Laser Sintering* SLS. Questi sistemi utilizzano sorgenti di energia per fondere materiali in polvere, eliminando la necessità di strutture di supporto⁴. La tecnologia opera mediante l'inserimento di un gas all'interno della camera di lavorazione, con lo scopo di ridurre la concentrazione di ossigeno e, di conseguenza, eliminare il rischio di combustione⁴. Queste tecnologie permettono una corretta e precisa adesione tra gli strati del prodotto finito; ciò consente la realizzazione di manufatti esatti, complessi e a comportamento isotropo quasi completo. Tuttavia, le stampe hanno superfici di scarsa qualità, richiedono una post lavorazione e sono particolarmente porose⁴. In questi strumenti additivi, i materiali utilizzabili sono ridotti ai polimeri e ai ceramici, pertanto hanno un piccolo range di utilizzo⁴.

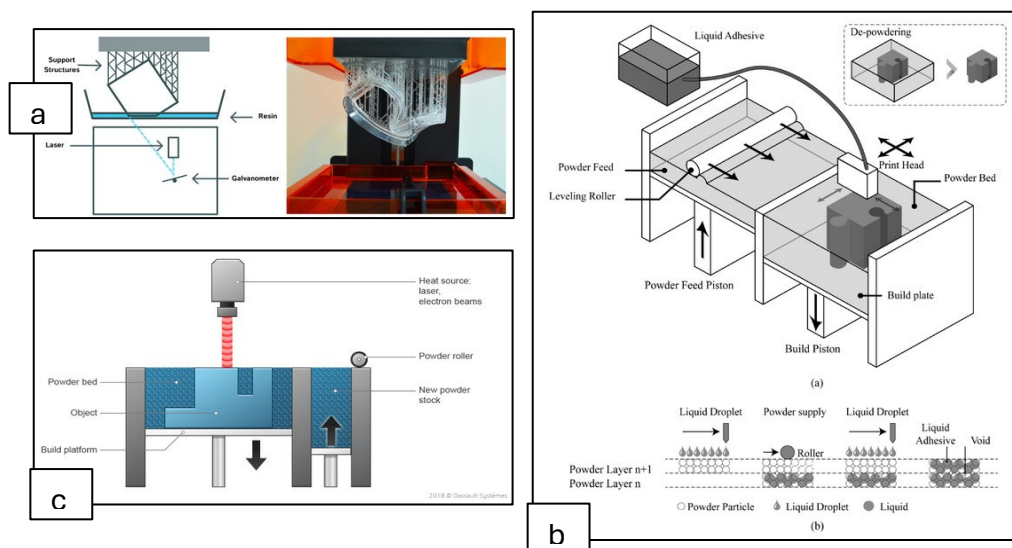


Figura 4: Tecnologia di stampa: Stereolitografia (a); Binder Jetting (b); Powder Bed Fusion (c)⁴

1.3. Materiali

1.3.1. Materiali polimerici

Gli scaffold impiantabili per la rigenerazione ossea devono garantire criteri come biocompatibilità, biodegradabilità e stabilità chimica. A questo riguardo, i materiali polimerici rivestono un ruolo centrale grazie alla loro elevata versatilità strutturale e funzionale, che consente di creare strutture orientate per specifiche applicazioni biomediche⁸. Tra di essi, ne fanno parte i polimeri naturali e sintetici⁸.

I polimeri naturali sono un'ottima fonte per la preparazione di biomateriali grazie alla loro biocompatibilità e alle loro proprietà immunogeniche⁸. Il gruppo comprende prevalentemente proteine e polisaccaridi che imitano componenti della matrice extracellulare. In questa categoria troviamo il collagene, fibrina, cheratina, chitina e chitosano⁸. I polimeri facenti parte di questo insieme hanno però alcuni limiti, tra cui la loro rapida degradabilità, scarse proprietà meccaniche, complessità nella personalizzazione delle loro proprietà e insorgenza di possibili di reazioni allergiche⁸.

All'opposto, i polimeri sintetici sono anch'essi un'ottima fonte in virtù della loro minore immunogenicità, minor rischio di infiammazioni, migliori proprietà meccaniche e possibilità di regolare la biodegradabilità, cosicché la loro degradazione risulti compatibile con la ricrescita del tessuto bersaglio⁸. Esempi tipici includono l'acido polilattico PLA, acido poliglicolico PGA, copolimeri PLA/PGA e policaprolattone PCL⁸.

1.3.1.1. Materiali polimerici in letteratura

In letteratura sono stati ampiamente studiati i materiali polimerici sintetici e naturali nel settore biomedicale. Nella categoria dei polimeri naturali, il più adoperato nella rigenerazione ossea sfruttando la stampa 3D è il collagene, la proteina più abbondante nel corpo umano⁸. Data la sua considerevole presenza nella matrice extracellulare ECM delle ossa, il collagene manifesta eccezionale biocompatibilità e abbondanti fonti di prelievo⁸. Nonostante abbia proprietà biologiche degne di nota, dimostra insufficienti proprietà meccaniche per offrire stabilità strutturale da solo e pertanto viene spesso affiancato da altri polimeri⁸. Un esempio di utilizzo è lo scaffold cranico (Fig.5) realizzato da Li et al., generato dall'unione di PCL (50%) e di un precipitato derivante da una soluzione acida di collagene di tipo I (50%), con successiva aggiunta di ioni fosfato e calcio⁹. Attraverso quest'unione risulta possibile sfruttare le proprietà biologiche del collagene e il modulo elastico del PCL, adatto a prevenire il fenomeno dello

stress shielding. I risultati ottenuti sono coerenti con quanto esposto: il dispositivo ha mostrato ottima integrazione con l'osso e assenza di capsula fibrosa, segnale che la reazione da corpo estraneo non è avvenuta⁹.

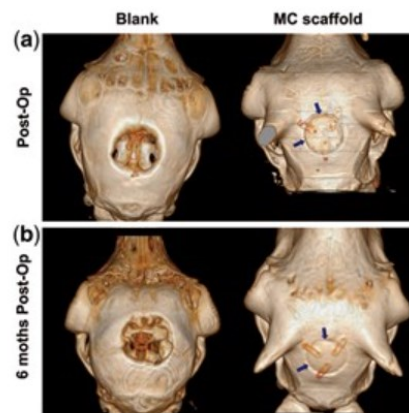


Figura 5: immagine di cranio ovino senza innesto e con innesto PCL + collagene⁹

Rispetto ai polimeri naturali, i polimeri sintetici evidenziano una maggiore lavorabilità e resistenza meccanica, ma minore velocità di degradazione e maggiore idrofobicità. Un esempio di spicco tra i polimeri sintetici è il PCL, apprezzato per la sua resistenza meccanica e biocompatibilità². Tuttavia, come tutti i polimeri sintetici, ha un lento tasso di degradazione, un'elevata idrofobicità e uno scarso numero di siti di legame per le cellule. Tali caratteristiche comportano una debole interazione cellula-scaffold². Al fine di ottenere una migliore interazione, gli scaffold in PCL vengono aggiunti di materiali più affini quali ad esempio la gelatina metacrilata GelMA, come sperimentato nel 2021 da Senem Buyuksungur et al., i quali hanno realizzato, tramite stampa 3D, uno scaffold ibrido col polimero e l'idrogel, caricato con cellule staminali della polpa dentale¹⁰ (Fig.6). Nello studio sono stati analizzati il riassorbimento, proprietà meccaniche, osteogenicità e proliferazione cellulare. I risultati hanno mostrato un'ottima resistenza meccanica dovuta alla presenza del PCL e un modulo elastico a compressione (106 Mpa) compatibile coi valori dell'osso trabecolare umano (65-873 MPa), sommata ad un'interazione cellula-scaffold efficace per la crescita cellulare e un'adeguata idrofilia grazie alla presenza del GelMA¹⁰.

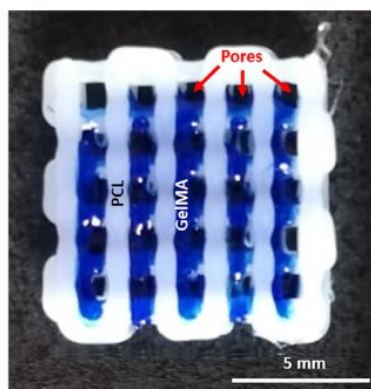


Figura 6: Scaffold PCL + GelMa ¹⁰

Un ulteriore materiale impiegato per migliorare le proprietà del PCL è la bredigite, una bioceramica studiata da Jun Hou e colleghi nel 2016¹¹. L'indagine scientifica era mirata all'analisi della degradabilità, citocompatibilità e osteogenesi di scaffolds porosi composti n-BPC, costituiti da PCL-PEG-PCL e nanobredigite n-BD (Fig.7). Sono state testate due composizioni con percentuali diverse di n-BD (20% e 40%), prodotte entrambe tramite *Salt leaching*, un metodo non controllato di sviluppo di pori eseguito tramite un porogeno (NaCl), lisciviato con un solvente. Gli esiti ottenuti hanno mostrato un maggiore assorbimento di acqua e maggiore degradabilità rispetto al solo polimero (rispettivamente 148% e 83%, contro i 77% e 49%), una migliore proliferazione cellulare e bioattività, nonché una maggiore osteogenesi (82% contro il 52%)¹¹.

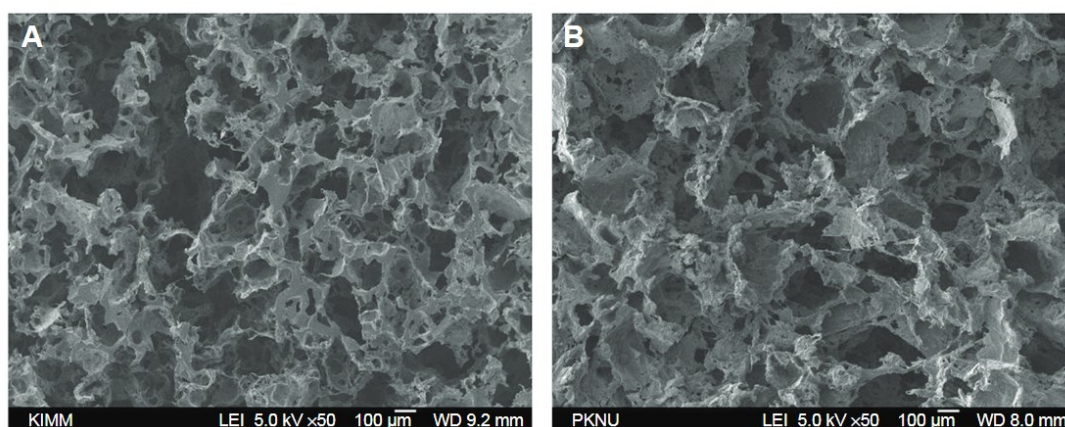


Figura 7: A: scaffold n-BPC; B: scaffold PCL-PEG-PCL¹¹

1.3.1.2. Materiali polimerici in commercio

In commercio sono disponibili numerosi materiali polimerici destinati ad applicazioni nei tessuti molli. Tra questi, particolare rilevanza assumono gli idrogel e i bioink utilizzati nelle tecniche di biostampa. Un fornitore altamente specializzato in questa tipologia di materiali è la *Cellink*¹², di cui alcuni materiali vengono descritti di seguito.

- *Lifeink 200 Collagen Bioink*: un prodotto a base di collagene di tipo I¹³. Esso è fabbricato a partire da residui di pelle bovina ispezionati ante e post mortem, sotto la supervisione di un veterinario, e viene preparato esclusivamente da parti di animali macellati, idonei al consumo umano, in accordo con le legislazioni comunitarie¹³. L'azienda descrive il prodotto come un *bioink* a ph neutro con concentrazione salina fisiologica e consiglia di utilizzare il prodotto descritto in tecniche di stampa a freddo con una temperatura di 2-8°C¹³.
- *Alginate 5%*: un idrogel viscoso, a ph neutro, adatto alla biostampa, utilizzabile da solo, unendolo ad un altro idrogel o diluendolo per ottenere la concentrazione desiderata¹⁴. Viene definito come un *bioink* nel 3D *bioprinting*, nell'ingegneria tissutale, nella medicina rigenerativa e nei dispositivi biomedicali. Tuttavia, viene chiaramente detto che non è utilizzabile sull'uomo, ma solo a scopo di ricerca¹⁴.
- *Chitoink*: un idrogel a base di chitosano meccanicamente stabile e con una buona affinità cellulare¹⁵. Incorporandolo con alcune molecole (glucomannano e sale di glicerolo fosfato), è facilmente stampabile, a ph fisiologico, garantendogli proprietà meccaniche sufficienti per il suo utilizzo¹⁵. Anche questo materiale, come il precedente, è impiegabile solo a scopo di ricerca¹⁵.

Un ulteriore esempio di azienda operante nel settore della rigenerazione dei tessuti molli è *Lattice Medical*, società francese specializzata nello sviluppo di dispositivi bioassorbibili stampati in 3D per applicazioni di medicina rigenerativa di tessuti molli e ricostruzione tissutale¹⁶. In particolare, l'azienda ha sviluppato due dispositivi innovativi per la rigenerazione dei tessuti molli di seguito riportati.

- Il primo riportato è *MATTISSE*, un impianto mammario riassorbibile realizzato mediante stampa 3D, progettato per guidare la rigenerazione progressiva del tessuto adiposo della paziente¹⁷. Il dispositivo è caratterizzato da una base porosa su cui fissare il tessuto autologo da rigenerare e da una cupola, utile a definire il volume e la forma desiderati¹⁷ (Fig.8).

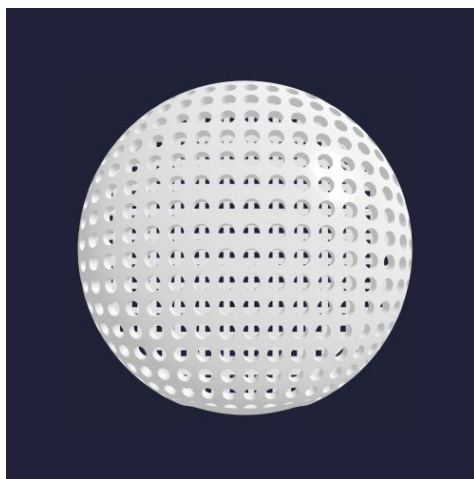


Figura 8: MATTISSE¹⁷

- *RODIN*, una matrice impiantabile e riassorbibile, destinata alla ricostruzione autologa del tessuto sottocutaneo¹⁸. Il dispositivo è rappresentato da una struttura porosa realizzata con stampa 3D, progettata per migliorare il *lipofilling*, ossia l'innesto adiposo¹⁸. Le sue caratteristiche strutturali favoriscono l'adesione e la proliferazione cellulare, consentendo un'adeguata angiogenesi¹⁸ (Fig.9).

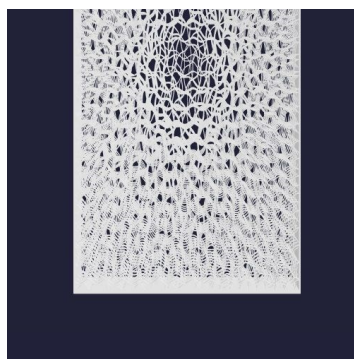


Figura 9: RODIN¹⁸

Oltre ai materiali destinati ai tessuti molli, il mercato offre numerosi polimeri impiegati nella rigenerazione ossea, nella realizzazione di scaffold strutturali e nella produzione di dispositivi medici impiantabili. In questa categoria rientrano diversi polimeri sintetici biodegradabili e non biodegradabili, commercializzati da aziende specializzate.

Una di queste è la *Corbion*, ditta olandese che spazia dal *food markets* al *biomedical markets* producendo ingredienti a base biologica e biopolimeri a scopo medicale¹⁹. Basati su monomeri lattide, glicolide e caprolattone, i biopolimeri riassorbibili *Purasorb* coprono la produzione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci e di dispositivi medicali¹⁹. Gli articoli sono completamente degradabili in composti naturalmente processati e metabolizzati dal corpo umano¹⁹. I *Purasorb* per i dispositivi biomedicali vengono realizzati a partire da differenti polimeri come il poli(L-lactide) PL. Tutti questi possono essere utilizzati assieme per la realizzazione di copolimeri¹⁹. Ogni materiale presenta una forma diversa con rispettiva viscosità intrinseca che si estende in un range da 0.2 dl/g a 7.5 dl/g¹⁹.

Una seconda rilevante azienda è la *Evonik*, multinazionale tedesca specializzata nella fabbricazione di prodotti chimici. La ditta opera in svariati settori: dall'agricoltura all'*automotive*, dalla nutrizione animale ai *medical devices*²⁰. In quest'ultimo, spazia dalla realizzazione di materiali innovativi per stent cardiovascolari alla creazione di impianti permanenti ortopedici e allo studio di tessuti bioingegnerizzati²⁰. Tra i principali prodotti appartenenti alla categoria dei materiali polimerici sintetici, vengono presi in esame due dispositivi, descritti di seguito.

- *Resomer* è una gamma di polimeri biodegradabili standard, personalizzati e specializzati, in forma di polveri, granuli e filamenti per applicazioni mediche di stampa 3D²¹. La raccolta comprende un'alta varietà di famiglie e composizioni di polimeri: lattide, caprolattone, glicolide, lattide-PEG e co-polimeri. Ognuno di questi prodotti presenta caratteristiche in termini di proprietà meccaniche, sicurezza, efficacia, biocompatibilità, lavorabilità e tempo di degradazione biologica che va da un minimo di 4 settimane ad un massimo di 3 anni²¹. Inoltre, la multinazionale garantisce “dati affidabili in termini di qualità e sicurezza, proprietà meccaniche personalizzabili e stabilità dopo la sterilizzazione”²¹.
- *Vestakeep* è un catalogo di materiali in poli-etere-etere-chetone PEEK ad alte performance per applicazioni biomedicali²². Di questi materiali vengono offerte soluzioni per *devices* medicali impiantabili a lungo termine, membrane mucose permanenti in ambito dentale e dispositivi destinati ad un breve tempo di contatto coi tessuti fisiologici²². Alcune delle loro caratteristiche più di rilievo sono eccellente biocompatibilità, resistenza ai metodi di sterilizzazione, proprietà eccellenti di resistenza a fatica, alta resistenza chimica ed ottima biostabilità²².

Un terzo esempio è rappresentato dalla *Lattice Services*, società specializzata nello sviluppo e nella commercializzazione di filamenti per stampa 3D destinati ad applicazioni biomedicali²³. L'azienda offre diversi materiali, comprendenti sia polimeri non biorassorbibili, come *Medical PETG* (polietilene glicolo) e *Medical TPU* (elastomero termoplastico), sia materiali biorassorbibili, come *Caprolactisse 100*, a base di PCL, e *Glycolactisse 85/15*, costituito da poli(acido lattico-co-glicolico) (PLGA)²³.

Il catalogo include inoltre formulazioni composite contenenti idrossiapatite, come *Caprolactisse HA* (70% PCL 30% HA) (Fig.10) e *Glycolactisse HA* (90% PLGA 10% HA), sviluppate per incrementare la bioattività del materiale grazie alle proprietà dell'HA²³.



Figura 10: *Caprolactisse HA*²³

Osservando la quantità di materiali polimerici sul mercato è evidente quanto essi siano utilizzati in ambito sanitario per la rigenerazione ossea e quanto possano spaziare nei settori medicali. In secondo luogo, le evidenze scientifiche hanno dimostrato la loro versatilità e i loro benefici in medicina, da cui ne è risultata una crescita del loro impiego.

1.3.2. Materiali bioceramici

Un altro materiale noto per le sue proprietà ottimali in bioingegneria è la bioceramica. Questo tipo di materiale è caratterizzato da ottima biocompatibilità e bioattività, il che lo rende adatto ad entrare in contatto con tessuti e fluidi biologici². Alcune tipologie presentano inoltre biorassorbibilità, permettendo la degradazione, la stimolazione dell'attività osteoblastica e la promozione dell'osteogenesi. Malgrado ciò, evidenziano una scarsa resistenza meccanica ed elevata fragilità⁵.

Le bioceramiche possono essere suddivise in materiali ceramici bioattivi e biologicamente inerti. La differenza fondamentale tra le due classi risiede nel fatto che la protesi sia o meno legato chimicamente al tessuto vivente dopo l'impianto². Nei bioattivi troviamo materiali come il fosfato tricalcico TCP, l'idrossiapatite HA e i bioglass; nei bioinerti la zirconia e l'alluminia².

1.3.2.1. Materiali ceramici bioattivi in letteratura

La classe dei materiali ceramici bioattivi è di particolare interesse bioingegneristico perché permette la formazione di legami coi tessuti fisiologici, senza innescare una reazione avversa dall'organismo, favorendo al contempo l'adesione cellulare. In particolare, si evidenzia che il TCP ha la caratteristica di rilasciare ioni Ca e P, utili per l'osteogenesi, e che l'osso umano è identico chimicamente per il 70% in peso all'HA². Queste qualità rendono i due materiali bioattivi. Ciò nonostante, le due ceramiche hanno tempi di degradazione lunghi e proprietà meccaniche relativamente deboli, pertanto necessitano di essere affiancati a materiali, come i polimerici, che permettono di compensare le carenze degli stessi².

Un ulteriore materiale ceramico bioattivo di discreto interesse è il bioglass. Il biovetro è caratterizzato da un'elevata concentrazione di Ca, P e Si. Questa composizione lo rende altamente compatibile con il corpo umano. La sua degradazione, infatti, comporta non solo il rilascio di ioni Ca e P, ma anche l'emissione di ioni Si, i quali contribuiscono alla prevenzione delle infezioni grazie alla loro efficacia antibatterica². Questa peculiarità del biovetro è stata frutto di ricerche e sperimentazioni, come sviluppato da Rodrigo L. M. S. Oliveira et al.²⁴. Le attività condotte hanno permesso di realizzare uno scaffold in biovetro, prodotto con metodologia *Sponge Replication Technique*, successivamente incorporato con molecole di Ag, conosciuto per le sue proprietà battericide. Lo scaffold era formato dunque da uno scheletro in biovetro e uno strato superficiale di gel silicato con nanoparticelle di Ag, in modo da favorire l'adesione cellulare e l'azione antibatterica contro famiglie di *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. I dati ottenuti descrivono difatti una porosità elevata, una resistenza ideale alla manipolazione in fase di intervento (227 kPa a compressione) e un'attività antibatterica adeguata²⁴.

In alternativa, Jing in e colleghi hanno esaminato i comportamenti di un vetro bioattivo borosilicato BSG, addizionato con tetrossido di ferro Fe₃O₄, in una condizione di osteomielite da *Staphylococcus aureus*²⁵. L'innesto in questo caso è stato fabbricato mediante colata in stampo cilindrico di BSG e nanoparticelle di Fe₃O₄. Gli obiettivi erano: eliminazione dei batteri, promozione della rigenerazione ossea e verificare di bioriassorbimento. Gli outcome hanno confermato il raggiungimento degli scopi in quanto sono stati rilevati: eliminazione dei batteri

e degli ascessi SACs, riduzione dell'inflammazone, bassa tossicità e significativa rigenerazione ossea²⁵.

Ponendo l'interesse sulle tecnologie di stampe 3D, si fa riferimento a ricerche scientifiche come quella svolta da Gary Fielding e Susmita Bose²⁶, nella quale è stato prodotto uno scaffold in β -tricalcio fosfato (β -TCP), addizionato a SiO_2 e ZnO , usando una *Powder-Bed Inkjet* e impostando pori di 300 μm (macroporosità pari a 35%). Per confronto, sono stati analizzati scaffolds con e senza l'aggiunta di SiO_2 e ZnO . I risultati negli scaffolds dopati evidenziano maggiore osteogenesi, angiogenesi (rilevata con analisi del vWF), attività osteoblastica e produzione di collagene²⁶.

Il β -TCP può essere accoppiato inoltre con l'HA (rispettivamente in proporzione 40% e 60%) al fine di realizzare uno scaffold ceramico in fosfato bicalcico BCP, utilizzato nell'articolo descritto da Wang et al²⁷. Nell'indagine scientifica è stata fabbricata una matrice bioattiva (*virus-activated matrix* VAM, Fig.11), costituita da scaffold bioceramico BCP, chitosano, cellule staminali mesenchimali MSCs e nanofibre di fago M13, un virus filamentoso che espone la sequenza peptidica RGD, usata per attivare cellule endoteliali. Il risultato è un'impalcatura ceramica con matrice bioattiva. Il tutto è stato poi testato su difetti del radio nei ratti, mostrando una significativa formazione ossea e un'elevata attivazione delle cellule endoteliali coinvolte nei processi di angiogenesi²⁷.

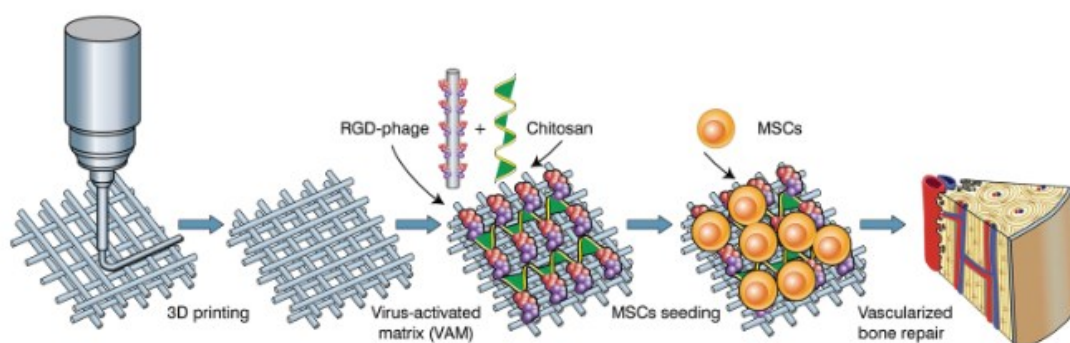


Figura 11: schema riassuntivo di composizione del VAM²⁷

1.3.2.2. Materiali ceramici bioattivi in commercio

La bioceramica è un materiale ampiamente utilizzato in ambiente medico vista la sua versatilità di produzione. Per questo motivo, esistono molte aziende produttrici di dispositivi medicali costituiti da tale materiale.

Lithoz è un'azienda austriaca operante nel mercato e nella tecnologia delle stampanti 3D, dei materiali e delle soluzioni per la produzione industriale di ceramiche²⁸. La ditta utilizza tecnologie di stampa VAT e si sviluppa nel settore della produzione additiva spaziando dal campo aerospaziale al campo medico-dentale²⁸. In quest'ultimo settore si trovano prodotti come il *LithaBone HA 400-480*, *LithaBone TCP 300* e *LithaCone 3Y 210*.

Il *LithaBone HA* è un manufatto a base di HA, stampabile in 3D, appositamente studiato per la produzione di impianti ceramici specifici. Vengono esposte due tipologie dello stesso prodotto: *HA 400* e *480*^{29 30}. La prima evidenzia una densità relativa dell'85% rispetto al 92-95% della sua controparte e una porosità del 15% contro una del 28% di massima. In aggiunta, è riportato che la forma *480* manifesta spessori della parete molto più elevati rispetto alla *400* e pertanto una flessibilità migliore nelle geometrie^{29 30}. Entrambe le forme sono simili ma vengono utilizzate in applicazioni leggermente diverse: la più sottile, ovvero la *400*, è impiegata in chirurgia, impianti sostitutivi ossei e scaffolds; l'altra è adatta alla chirurgia craniomaxillofacciale, neurochirurgia e impianti sostitutivi ossei^{29 30}.

Un secondo prodotto dell'azienda è il *LithaBone TCP 300*, un impasto contenente una ceramica a base di β -TCP³¹. Come già esposto, il materiale ceramico di cui il prodotto è costituito garantisce un'eccellente biocompatibilità, biorassorbibilità e semplicità di produzione. Per di più, variando il processo di sinterizzazione è possibile ottenere una densità relativa massima del 98% e una porosità del 2%. Come il *LithaBone HA 400*, anche il *TCP 300* è applicabile in chirurgia, impianti sostitutivi ossei e scaffolds³¹.

Sul mercato agiscono anche aziende che producono polveri bioceramiche pronte per essere utilizzate nella fabbricazione di dispositivi. L'azienda presa d'esempio è la *CAM Bioceramics*, dedita alla realizzazione di prodotti per l'industria ortopedica, dentale, estetica e dei sistemi di rilascio controllato di farmaci³². Essa realizza polveri e granuli di HA, α -TCP, β -TCP e bifase HA/TCP, ognuno personalizzato in termini di dimensione dei pori, distribuzione granulometrica, forma delle particelle, fluidità e solubilità³². La polvere di HA, fabbricata con metodo di essiccazione a spruzzo, è adoperata per rivestimenti lisci e altamente adesivi, favorendo un'alta fluidità, velocità e resistenza dell'osteointegrazione, unitamente a riempitivi per tessuti molli con la possibilità di variare la dimensione delle singole particelle (75-125 μm o 25-45 μm)³³. La β -TCP è sviluppata sotto due forme: polvere con particelle di 20-60 μm per la formazione di superfici altamente porose, ideali assieme a polimeri per le viti osse, e macinata (5 μm) finalizzata a garantire rotondità e migliorarne la versatilità³⁴. L'altra variante di TCP, ovvero l' α -TCP, è commercializzata solo come polvere di cemento altamente reattiva,

caratterizzata da particelle di 5 μm , risultando quindi particolarmente adatta a cementi ossei grazie alla rapida presa ed eccellente iniettabilità³⁴. La polvere composita HA/ β -TCP si presenta come una struttura completamente reticolata, altamente porosa ed osteogenica, dunque adottata come riempitivo di cavità ossee³⁵. Infine, sono anche realizzabili granuli di HA/ β -TCP e di β -TCP della dimensione di 0,4-4 mm, recanti macroporosità di 600 μm , implementati per favorire l'adesione cellulare e la circolazione sanguigna³⁶.

1.3.3. Materiali metallici

I materiali metallici sono un'altra classe spesso utilizzata nella sostituzione ossea. Ne fanno parte l'acciaio inossidabile, leghe di titanio e magnesio. Le loro peculiarità sono resistenza meccanica, biocompatibilità, azione antibatterica e promozione di osteoblastogenesi ed angiogenesi². Va tuttavia considerato che gran parte dei metalli non è biorassorbibile e pertanto necessitano di un intervento chirurgico di rimozione nel caso in cui lo scaffold venga impiantato temporaneamente². Va sottolineato anche che tali materiali possiedono un maggiore modulo elastico rispetto al tessuto osseo, il che può causare il fenomeno dello *stress shielding* e una scarsa adesione ai tessuti².

1.3.3.1. Materiali metallici in letteratura

Siccome la riassorbibilità rappresenta una proprietà di elevato interesse biomedico, le leghe a base di magnesio hanno suscitato attenzione dalla ricerca. Le leghe di magnesio, oltre ad essere biodegradabili, possiedono anche un modulo elastico molto simile al tessuto osseo, permettendo dunque di limitare l'insorgenza dello *stress shielding*². Nonostante ciò, manifestano una scarsa resistenza meccanica, una veloce degradazione e perdita di resistenza, il che comporta la necessità di essere affiancati ad altri materiali². Un esempio è descritto da Jianting Ye e colleghi, i quali hanno preparato uno scaffold in lega di magnesio JDBM (Mg-Nd-Zn-Zr), stampato tramite *Powder Bed Fusion* e rivestito successivamente da un *coating* bioattivo a base di Stronzio-Fosfato octalcico Sr-OCP³⁷. Lo scaffold è stato ottenuto con una porosità pari al 65% per garantire caratteristiche biomimetiche simili all'osso spongioso, favorendo la crescita vascolare³⁷. Il rivestimento ha permesso di aumentare la rugosità superficiale e l'idrofilia dello scaffold, consentendo pertanto un miglioramento dell'adesione cellulare e dell'idrofilia³⁷. Lo studio ha mostrato una migliore biocompatibilità, capacità di vascolarizzazione e rigenerazione ossea in vitro e in difetti femorali murini³⁷.

Oltre alle leghe di magnesio, sono state studiate anche leghe caratterizzate da alta percentuale di Zn ottenute attraverso *Laser Powder Bed Fusion* LPBF. In letteratura³⁸ è stato osservato che scaffold porosi in lega Zn-0.8Li, realizzati tramite LPBF e con conformazione *gyroid*, dimostrano un incremento significativo della resistenza meccanica e del mantenimento di una duttilità sufficiente, nonché una corrosione più uniforme e controllata rispetto allo Zn puro. Inoltre, la lega ha rivelato una risposta immunologica positiva ed è risultata idonea ai processi AM senza alterare composizione e microstruttura³⁸. Da tali risultati, le leghe a base di Zn hanno un elevato potenziale per un futuro impiego come materiali metallici biorassorbibili.

1.3.3.2. Materiali metallici in commercio

Ad oggi, il mercato evidenzia una carenza di materiali metallici bio-rassorbibili disponibili in forma di polvere, realizzati tramite tecnologia AM e accompagnati da certificazioni idonee all'impiego biomedicale. Le tecnologie AM mostrano ottimi potenziali per la realizzazione di manufatti metallici biorassorbibili, ma permangono limiti che ne ostacolano l'attuazione. Alcuni di questi sono il controllo della velocità di degradazione, la difficoltà nel garantire resistenze meccaniche adeguate e la complessità legata alla lavorazione³⁹. Pertanto, in commercio è possibile trovare esclusivamente elementi fabbricati attraverso metodologie di produzione tradizionali. A titolo d'esempio, è possibile citare la *Syntellix*, azienda tedesca proprietaria della *Magnezix*, la prima lega metallica biorassorbibile a ricevere l'approvazione CE nel 2013⁴⁰. Il materiale viene definito come una lega naturale soggetta a degradazione entro 12 mesi e radiotrasparenza, un fenomeno relativo alla dissolvenza del materiale oltre che alla perdita di massa e peso, osservabile durante controlli radiologici⁴⁰. La lega viene dichiarata osteoconduttiva e pertanto, durante la perdita di massa, avviene la formazione di neo-tessuto osseo⁴⁰. La corrosione del materiale consente di creare un ambiente basico e di rilasciare ioni idrogeno nel tessuto, cosicché venga inibita la crescita batterica e vengano preservate le cellule⁴⁰. La ditta produce due dispositivi diversi con la *Magnezix*: *Compression Screws CS* e *Pin* (chiodi senza filettatura), entrambi realizzati attraverso tecnologie di produzione tradizionale (Fig.12)⁴⁰.

Le *CS* sono utilizzate per ripristinare la continuità ossea a livello di articolazioni a seguito di fratture od osteotomie, per il trattamento di pseudoartrosi e di avulsioni ossee. Oltre alla biorassorbibilità, i punti di forza formalmente indicati sono: punta della vite autofilettante, vite cava per un posizionamento controllato tramite filo e passo diverso nelle filettature della testa e dell'asta in modo da permettere forze di compressione⁴¹.

Il *Pin* è un chiodo senza filettatura, adoperato per ristabilire la continuità ad elementi ossei in successione a fratture da avulsione e per il fissaggio di porzioni ossee a seguito di riduzione. Tralasciando la biorassorbibilità, considerata requisito intrinseco, le caratteristiche vantaggiose esplicitate sono molteplici. La testa piatta consente di evitare sporgenze eccessive, mentre la conformazione rientrata migliora il posizionamento dello strumento utilizzato per l'inserimento della vite. In aggiunta, la presenza di collari sull'asta permette di indurre compressione del frammento osseo libero durante l'inserimento. Infine, la punta senza collari facilita il posizionamento del perno nel letto implantare perforato⁴¹.



Figura 12: Magnezix CS 2.0 e Pin 1.5⁴⁰

1.4. Materiali stampati in 3D e odontoiatria.

1.4.1. Osso alveolare e difetti ossei

La rigenerazione ossea guidata è una tecnica ampiamente utilizzata anche in ambito odontoiatrico in casi clinici come la perdita del tessuto osseo alveolare.

L'osso alveolare è la porzione di osso mascellare e mandibolare deputata al sostegno dell'arcata dentaria e alla formazione degli alveoli dentali. Esso svolge un ruolo fondamentale nelle attività orali in quanto permette l'ancoraggio degli elementi dentali e la distribuzione delle forze generate durante la masticazione⁴². Il tessuto è anatomicamente composto da una porzione di osso corticale compatto che prende il nome di lamina dura. Quest'ultima rappresenta il sito di azione del legamento parodontale, utile all'ancoraggio del dente all'alveolo, attraverso le fibre di inserzione ed origine denominate fibre di Sharpey. Oltre alla lamina dura, si trova il tessuto osseo alveolare di supporto, costituito da una componente corticale e trabecolare, capace di descrivere un'ottima resistenza biomeccanica⁴². Dal punto di vista biologico, l'osso alveolare è costituito da una componente minerale ricca di idrossiapatite e una matrice organica composta prevalentemente da collagene di tipo I, osteoblasti, osteoclasti ed osteociti (Fig.13)⁴².

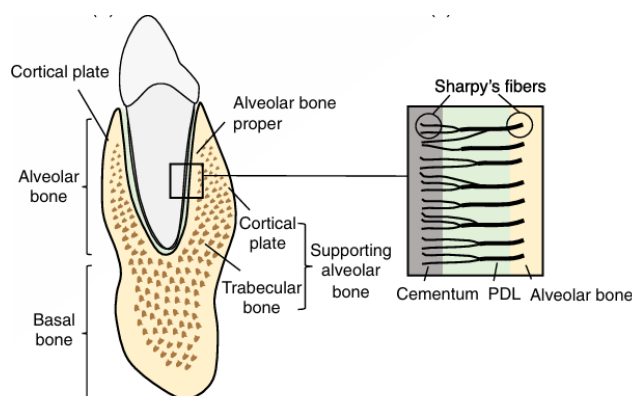


Figura 13: Rappresentazione della struttura dell'osso alveolare e del legamento parodontale⁴²

Come altre strutture del medesimo tessuto, l'osso alveolare è soggetto a rimodellamenti mediati dall'equilibrio tra attività osteoblastica ed osteoclastica. Tale equilibrio consente di mantenere la struttura ossea e dunque di supportare i denti⁴². A differenza delle altre ossa, però, è molto sensibile al processo, alla luce delle ripetute forze applicate agli elementi dentali²⁴. A conferma di ciò, nel 2004 un team di ricercatori osservò, in cavie murine sottoposte ad una “soft-diet” finalizzata alla riduzione del carico masticatorio, un riassorbimento dell'osso in questione⁴³.

A seguito di quanto detto, l'osso alveolare è definibile come un tessuto particolarmente sensibile a situazioni non fisiologiche, quali assenza di carichi ripetuti ed eventi patologici ed avversi.

Uno degli eventi avversi è per esempio l'estrazione dentale, la quale innesca una cascata di eventi biologici mediati dalla risposta infiammatoria locale e dalla riduzione della funzione masticatoria del parodonto⁴⁴. Queste due componenti determinano un'alterazione dell'omeostasi e dell'integrità strutturale dei tessuti parodontali, i quali assieme innescano un processo di atrofia e riassorbimento dell'osso alveolare⁴⁴.

Un altro fattore che induce la perdita dell'osso alveolare è la parodontite, una malattia infiammatoria cronica causata da uno squilibrio del microbiota orale, chiamato disbiosi⁴⁵. La suddetta infiammazione comporta una degradazione dei tessuti parodontali e un rilascio di sostanze che alimentano la proliferazione batterica, promuovendo inoltre lo stato di disbiosi⁴⁵. In questa situazione non fisiologica intervengono le cellule immunologiche (neutrofili, linfociti) e il sistema del complemento per collaborare nella risposta infiammatoria⁴⁵. Alla luce di ciò, interviene il sistema RANKL/RANK/OPG, un meccanismo fisiologico di regolazione dell'equilibrio osseo. Il RANKL, una citochina prodotta dalle cellule immunitarie, stimola la

maturazione degli osteoclasti attraverso il legame col recettore RANK; l'OPG è invece una glicoproteina che regola la differenziazione degli osteoclasti⁴⁵. Considerato lo scenario di parodontite e pertanto la risposta infiammatoria mediata dalle cellule immunologiche, il sistema appena descritto è sbilanciato in direzione della maturazione degli osteoclasti e dunque orientato al riassorbimento osseo⁴⁵.

1.4.2. Gabbie per la rigenerazione del tessuto osseo alveolare in commercio

Al fine di correggere la perdita ossea, si ricorre all'utilizzo di *mesh* o gabbie per isolare il sito di interesse del difetto e permettere la rigenerazione del tessuto (gabbie GBR). Come in altri settori, in odontoiatria vengono utilizzati tradizionalmente materiali come leghe in titanio, le quali però richiedono l'estrazione tramite intervento chirurgico.

Nel mercato di questo settore, si possono osservare molteplici prodotti industriali. Uno di questi è *Yxoss CBR*, una *mesh* personalizzata in titanio, realizzata da *ReOss GmbH*, stampata in 3D per il trattamento di difetti complessi dell'osso alveolare⁴⁶ (Fig.14). La sua caratteristica è quella di essere disegnata per via digitale: dall'acquisizione di una *Cone Beam Computed Tomography* CBCT del difetto, viene ricostruita la geometria 3D dell'osso, definita la ricrescita desiderata e successivamente progettato e prodotto lo scaffold adatto per il singolo caso clinico⁴⁶. Il dispositivo ha una struttura reticolare con maglie precise e punti di rottura controllati per una rimozione facile e veloce⁴⁶. L'azienda produttrice mette a disposizione due varianti:

- *Classic*: completamente aperta, favorisce la vascolarizzazione periostale⁴⁶;
- *Protect*: presenta una microstruttura addensata nella parte apicale consentendo una minore infiltrazione dei tessuti neoformati nella *mesh*⁴⁶.

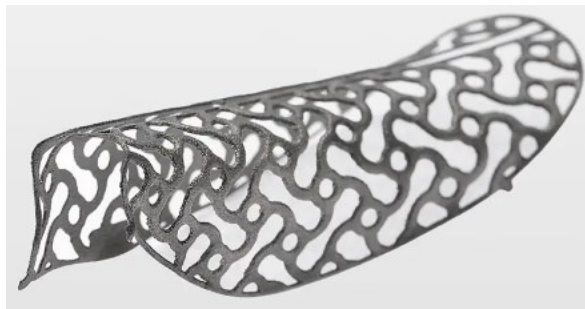


Figura 14: griglia Yxoss CBR classic della Geistlich USA⁴⁶

Prima dell'innesto, Il dispositivo è addizionato con tessuto osseo autologo e sostitutivo (es. *Geistlich Bio-Oss*) per favorire la ricrescita e la biocompatibilità⁴⁶. In successione all'impianto, viene coperto con una membrana riassorbibile per impedire la crescita di tessuto molle nella griglia⁴⁶.

Dagli esiti pubblicati dall'azienda, vengono definiti guadagni ossei medi verticali e orizzontali rispettivamente di $4.78 \pm 1.88\text{mm}$ e $6.35 \pm 2.10\text{ mm}$ e una percentuale di sopravvivenza del 100%, con assenza di complicanze biologiche. Nonostante ciò, il dispositivo necessita di rimozione chirurgica⁴⁶.

Un secondo prodotto, molto simile al precedente, è il 3D mesh fabbricato da *BTK – the smile system* che “garantisce il perfetto adattamento del biomateriale all'anatomia ossea del paziente e riduce i tempi operatori favorendo il successo della rigenerazione ossea”⁴⁷. Come la mesh già descritta, anche questa viene adoperata per sopperire alla mancanza di tessuto osseo prima dell'innesto protesico dentale. Il workflow è totalmente digitale e customizzato per ogni caso clinico⁴⁷. Il processo inizia con una CBCT dalla quale si elabora lo scaffold mediante software di modellazione CAD. Le caratteristiche e la morfologia dell'elemento, considerando anche le posizioni dei fori per le viti corticali, sono definite sulla base dell'anatomia specifica del singolo caso clinico. In seguito alla conferma del modello digitale, il prodotto viene stampato in titanio attraverso *Selective Laser Melting* SLM: polveri di titanio puro vengono fuse seguendo con precisione il modello digitale⁴⁶. L'operazione chirurgica è la medesima di quella già descritta: preparazione dell'intervento e dello scaffold con aggiunta di biomateriale (prelievo di osso autologo), alloggiamento della griglia, copertura con membrana riassorbibile e rimozione con secondo intervento chirurgico⁴⁶.

1.4.3. Auxetticità

Una struttura come quelle analizzate dovrebbe avere comportamenti meccanici utili in ambito chirurgico. Convenzionalmente, un materiale si deforma seguendo una logica regolare per la quale, all'applicazione di una trazione assiale, esso si espande lungo la direzione di applicazione della tensione e si contrae trasversalmente⁴⁸. Tale comportamento viene descritto dal rapporto negativo tra la deformazione assiale e quella trasversale. Il rapporto viene chiamato coefficiente di Poisson ν :

$$\varepsilon_y = \frac{\Delta y}{y_0}$$

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta x}{x_0}$$

$$\nu_{yx} = -\left(\frac{\varepsilon_x}{\varepsilon_y}\right)$$

dove Δy e Δx rappresentano rispettivamente la variazione della lunghezza assiale e trasversale, y_0 e x_0 indicano le lunghezze iniziali assiale e trasversale, mentre ε_y ed ε_x corrispondono alle deformazioni assiale e trasversale⁴⁸. Un materiale che si allunga assialmente e si contrae trasversalmente quando sottoposto a trazione o si contrae assialmente e si espande trasversalmente in risposta ad una compressione, possiede ν positivo. All'opposto, un materiale che si espande in più direzioni nel momento in cui è sottoposto a trazione e si contrae a seguito di compressione, ha un coefficiente di Poisson negativo e viene chiamato auxetico⁴⁸ (Fig.15).

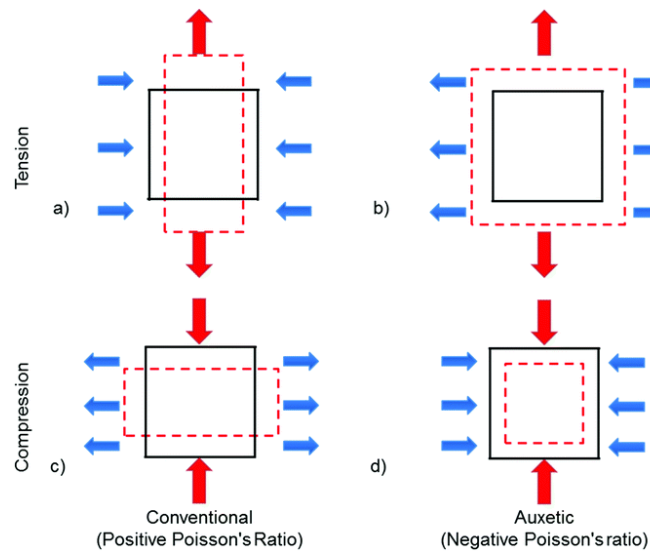


Figure 15: rappresentazione di un materiale auxetico⁴⁸

Ciascun materiale auxetico si deforma in modo diverso quando sottoposto a tensione o compressione. Questa proprietà non è definita dalla natura del materiale, bensì dalla sua struttura⁴⁹. Sono state definite tre classi di geometrie auxetiche: *re-entrant structures*, *chiral unit cells* e *rotating unit cells*⁴⁹.

- *Re-entrant structures*: possiedono pareti inclinate verso l'interno e strutture di differente forma. Tra queste vi è l'*honeycomb*, che si deforma con la flessione delle nervature diagonali; la *double arrowhead* e la *star honeycomb*, le quali devono il loro comportamento ai movimenti delle punte delle frecce e alle nervature del nido d'ape;

infine le strutture con celle unitarie, rese auxetiche dall'espansione e rotazione di linee delle celle unitarie ⁴⁹ (Fig.16).

- *Chiral unit cells*: composte da nervature diritte collegate ai nodi centrali, i quali possono essere cerchi o geometrie a ciclo chiuso. L'effetto auxetico è determinato dall'avvolgimento delle nervature attraverso la rotazione dei nodi in base al carico applicato ⁴⁹ (Fig.16).
- *Rotating unit cells*: presentano celle unitarie rigide di diversa forma, come triangoli e quadrilateri, responsabili della generazione dell'effetto desiderato in risposta alla rotazione delle stesse a seguito dell'applicazione di un carico ⁴⁹ (Fig.16)

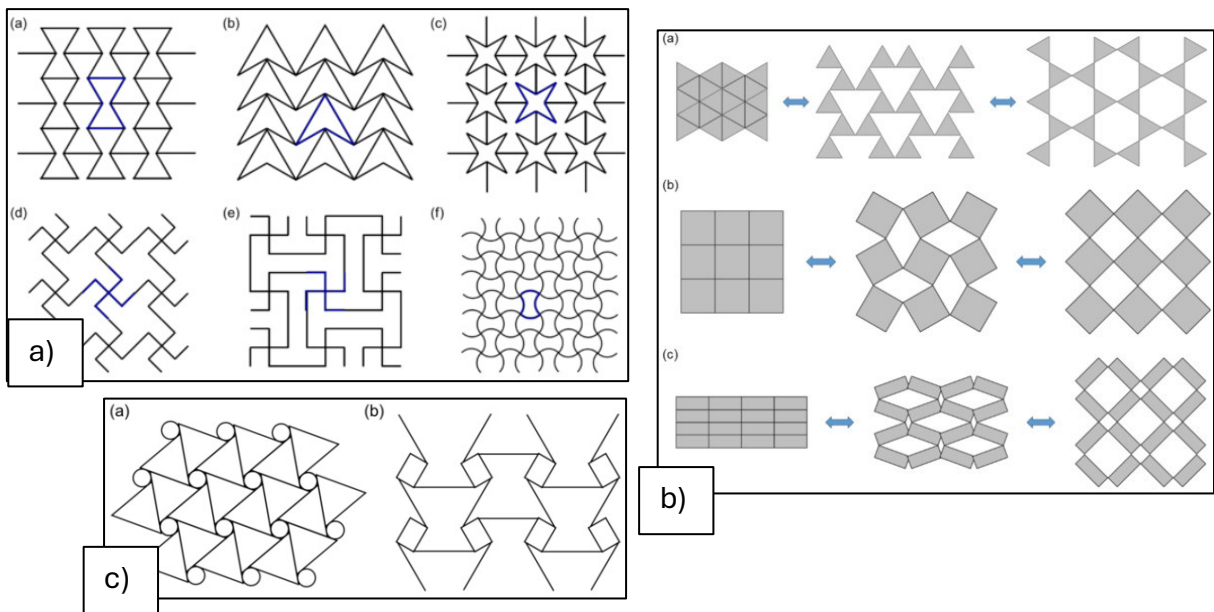


Figura 16: Re-entrant structures: re-entrant honeycomb (a.a), double arrowhead (a.b), star honeycomb (a.c), structurally hexagonal re-entrant honeycomb (a.d), lozenge grids (a.e), sinusoidal ligaments (a.f) (in grassetto si evidenziano le linee delle celle unitarie). Rotating unit structures: triangle unit cells (b.a), square unit cells (b.b), rectangle unit cell (b.c). Chiral structures: chiral structure with same units (c.a), chiral structure with symmetrical units (c.b) ⁴⁹

Nel campo della rigenerazione ossea, le strutture con coefficiente di Poisson negativo (NPR) possono influenzare positivamente le proprietà meccaniche, fisiche e biologiche degli scaffold⁵⁰. In particolare, è stato osservato che gli elementi NPR permettono una migliore proliferazione cellulare in quanto consentono una distribuzione isotropica del carico in tutte le direzioni⁵⁰. Quanto appena descritto è stato osservato dalla realizzazione di un aerogel di nanocellulosa con ν regolabile, costituito da una miscela di nanofibre di cellulosa e polietilenglicole diacrilato⁵⁰. Sono stati fabbricati tre aerogel con struttura dei macropori differente e personalizzata, adoperando la stereolitografia e consentendo pertanto di ricavare tre

diversi comportamenti meccanici: ν negativo, ν positivo e ν nullo. I micropori sono stati ottenuti successivamente tramite liofilizzazione. I tre elementi sono stati sottoposti a carichi meccanici e ne sono stati analizzati i comportamenti. Dai risultati è emersa la formazione di un ambiente favorevole alla crescita e proliferazione cellulare di cellule staminali mesenchimali nel dispositivo NPR⁵⁰.

In un secondo articolo, utile a confermare quanto detto⁵¹, gli autori hanno voluto studiare se una geometria auxetica stampata in 3D può essere meccanicamente adatta per scaffold ossei e biologicamente vantaggiosa in termini di disposizione e proliferazione cellulare. In questo studio sono state progettate strutture *re-entrant honey-comb* 3D (RHS) con montanti a sezione quadrata di 60 μm e angoli impostati a 75°, 90° e 105° (Fig.17).

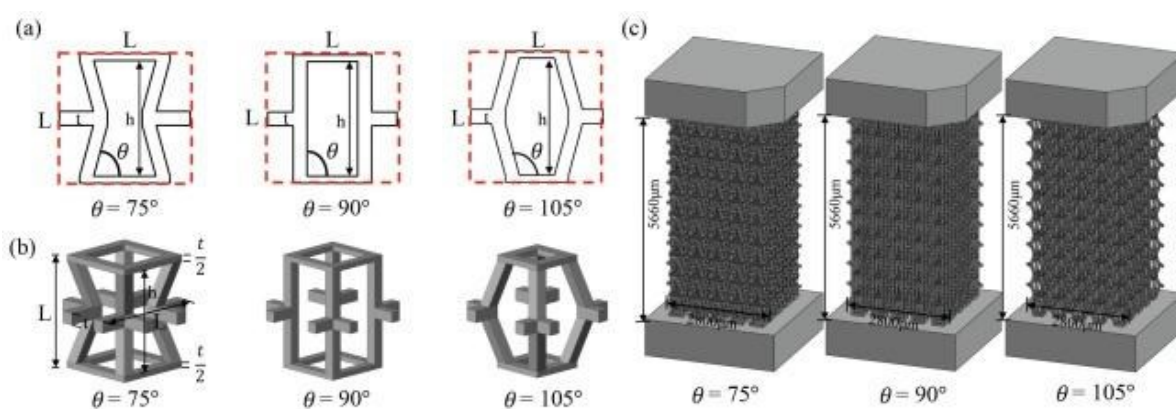


Figura 17: Schematic illustration of scaffold designs. 2D-Re-entrant honeycomb structures with different θ value design (a). 3D-Re-entrant honeycomb structures unit (b,c)⁵¹

Gli scaffold sono stati prodotti con un materiale polimerico biocompatibile di prova RG ($G=2.5$ Gpa) stampato in 3D tramite stereolitografia SLA. Ciascuna struttura è stata sottoposta ad analisi FEA, consentendo di osservare un comportamento anisotropo in tutte e tre le configurazioni. Tra queste, la struttura con gli angoli a 75° è risultata la più morbida in compressione assiale e l'unica con un coefficiente di Poisson negativo. Tale particolarità ha permesso un confronto controllato tra struttura geometrica auxetica e non auxetica. I risultati di test reali a compressione hanno messo alla luce un comportamento più tollerante per la NPR rispetto alle sue controparti. Dopo il punto di snervamento nel grafico sforzo-deformazione, la stampa a 75° è entrata in uno stato di deformazione stabile con fratture parziali, mentre le altre sono andate incontro a frattura completa⁵¹.

Per quanto concerne gli aspetti biologici, sono stati utilizzati pre-osteoblasti sotto condizioni di carico statico e ciclico (3.85% strain, 1 Hz, 1h/di) ed è stata misurata successivamente la quantità di poro occupata dalle cellule. I risultati hanno mostrato una migliore copertura

cellulare nello scaffold a 75° dal quarto giorno in poi, oltre a un *counting cell* maggiore nella stessa struttura⁵¹.

1.5. Scopo della tesi

Sulla base di quanto è stato detto finora, un obiettivo della ricerca scientifica in ambito odontoiatrico consiste nella realizzazione di gabbie biorassorbibili, in grado di favorire la rigenerazione ossea del tessuto perso e di degradarsi fino al riassorbimento. Il PCL è un esempio di materiale che permette di soddisfare le esigenze richieste, come mostrato in un report di rigenerazione dell'osso alveolare⁵².

Lo studio affronta la rigenerazione ossea in un paziente di 46 anni, presentante un difetto a seguito dell'estrazione di un dente. Lo scaffold prodotto è stato disegnato dapprima in modello digitale STL e successivamente stampato in PCL. Al momento dell'impianto, è stato integrato con osso autologo e con piccole particelle di minerale osseo bovino della grandezza di 0.25-1 mm, infine fissato con viti (Fig.18). A 6 mesi dall'intervento, è stata inserita la protesi dentale. I risultati mostrano un guadagno osseo sufficiente a ricostruire il difetto e a sostenere l'impianto dentale, ottenendo un'ottima stabilità ⁵² (Fig.19).

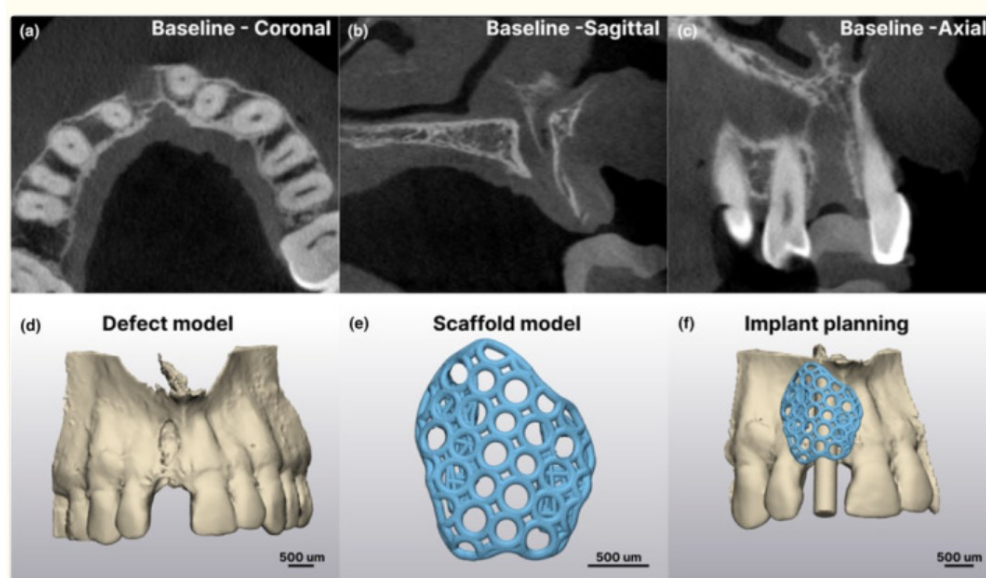


Figura 18: immagine CBCT del difetto osseo(a-c) e scaffold per la rigenerazione ossea (d-f)⁵²

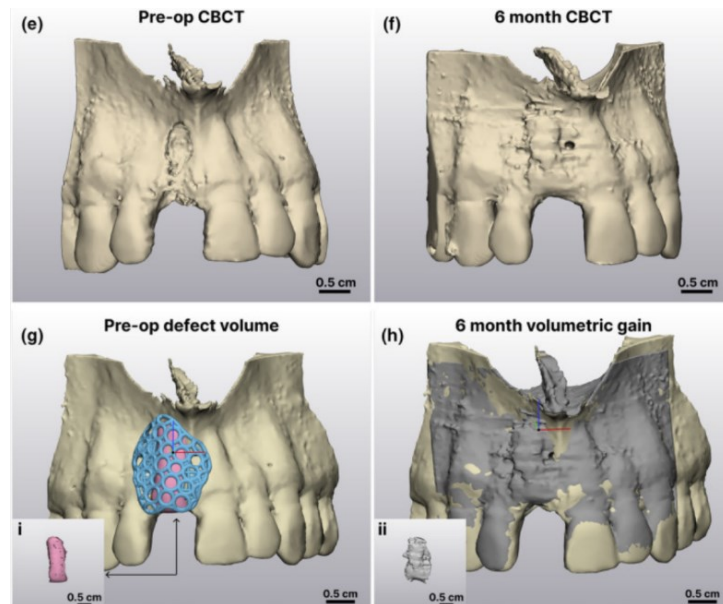


Figura 19: Rappresentazione 3D pre-op (e); rappresentazione 3D a 6 mesi post-op (f); rappresentazione 3D dello scaffold e del volume del difetto (in rosa) (g); rappresentazione 3D a 6 mesi post-op (h) in cui si osserva l'aumento del volume nel difetto tramite operazione booleana (ii) ⁵²

Un'altra possibilità d'intervento fa capo all'utilizzo di materiali ibridi formati da polimero e bioceramica. In particolare, si osserva un caso studio nel quale sono stati fabbricati scaffolds personalizzati in 3D utilizzando PCL, HA e polietilenglicolo PEG, caricato con farmaco indometacina IND⁵³. Sono stati sviluppati scaffolds con diverse percentuali di PEG e di IND, stampati con tecnica *Fused Deposition Modeling* FDM. I risultati sono stati ricavati attraverso l'utilizzo di calorimetria a scansione differenziale DSC, diffrazione dei raggi X e spettroscopia infrarossa. I risultati mostrano un'incorporazione ottima dell'IND negli scaffolds, adeguate proprietà per l'applicazione nell'alveolo osseo e infine un rilascio più uniforme e rapido dell'IND negli scaffolds con una quantità maggiore di PEG⁵³.

Sulla base di quanto osservato, è possibile studiare nuove metodologie di intervento nell'ambito della rigenerazione ossea alveolare. Da questo presupposto, il presente lavoro di tesi si propone di effettuare un'analisi microtomografica di scaffold costituiti da PCL, impiantati sul cranio di modelli murini, per tracciare la rigenerazione ossea e la degradazione del polimero. In questo contesto la tesi propone una metodologia che permette di separare diverse componenti biologiche presenti nella μ CT. Parallelamente, siccome l'obiettivo della ricerca è l'applicazione della medesima analisi in campo odontoiatrico, il lavoro mira allo sviluppo di un protocollo di modellazione geometrica di una gabbia GBR personalizzata, sviluppata a partire dalle CT del difetto osseo alveolare di un paziente.

Per il raggiungimento di tali obiettivi, vengono impiegati diversi software specialistici: il software *3D Slicer* per l'analisi dei file DICOM, MATLAB per l'elaborazione statistica dei dati ricavati dalle microtomografie e i software *Geomagic Design X* e *Rhino 3D* per le fasi di modellazione geometrica.

2. MATERIALI E METODI: metodologia di analisi delle μ CT

2.1. Microtomografie e scaffold sui campioni murini

Per raggiungere l'obiettivo dello studio sono stati definiti strumenti, metodi e modelli specifici. In particolare, per le analisi microtomografiche sui campioni murini sono stati progettati scaffold a forma di cupola, costituiti da una porzione basale cilindrica e da una porzione superiore emisferica. Le mesh sono state realizzate mediante tecnologia di stampa 3D con una geometria a cupola avente dimensioni di 4 mm di altezza e 8 mm di diametro interno. Inoltre, sono state progettate con due piccole estensioni laterali, ciascuna predisposta per l'alloggiamento di una vite di fissazione, con diametro di 1 mm e altezza di 3 mm. Gli scaffold presentavano inoltre delle forature, realizzate per favorire l'integrazione tissutale, la degradazione del materiale e l'angiogenesi. Dalle fasi di progettazione, è stata mantenuta una mesh rappresentativa dell'intero volume occupato dalla cupola stessa, in quanto essa permetterà di svolgere alcuni passaggi intermedi dell'analisi tissutale. La mesh verrà denominata "mesh Region Of Interest (ROI)" in quanto indicante la regione di nostro interesse (Fig.20).

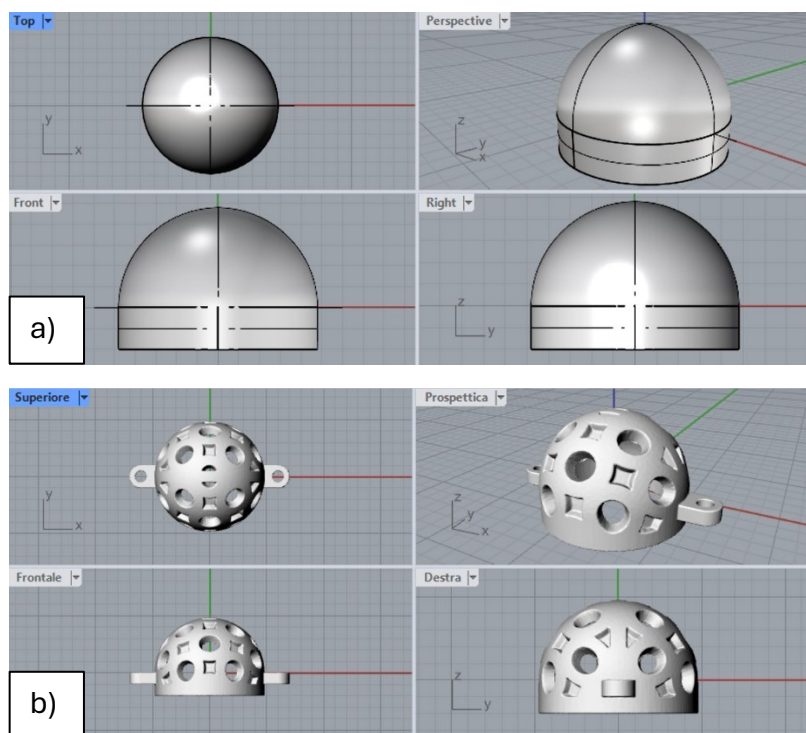


Figura 20: mesh rappresentante il volume della cupola (a); cupola impiantata(b)

Gli scaffold sono stati realizzati in PCL, poiché questo polimero sintetico presenta caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto alle applicazioni di ingegneria tissutale

ossea, come ampiamente riportato in letteratura. In particolare, il PCL è biocompatibile, biodegradabile e presenta un'elevata stampabilità mediante tecnologie di additive manufacturing².

La sperimentazione animale è stata condotta nel rispetto del Decreto Legislativo 14 marzo 2014, n. 26 sull'utilizzo degli animali a fini scientifici ed è stata approvata dall'Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA) dell'Università degli Studi di Padova. Lo studio ha coinvolto 54 ratti Sprague-Dawley maschi, di 25 settimane di età e del peso di circa 500 g, suddivisi in sei gruppi sperimentali (9 animali per gruppo) in funzione del materiale costituente la mesh. Per le analisi oggetto del presente lavoro sono stati considerati i campioni appartenenti al gruppo con mesh in PCL/HA (20%). All'interno degli scaffold sono state inserite due tipologie di materiale da innesto: osso autologo e osso eterologo bovino bioattivo, impiegati in proporzioni approssimativamente uguali (50% e 50%), dichiarate di volume circa pari a 0.18 mm³. Dopo 8 settimane dall'impianto, gli animali sono stati sottoposti a eutanasia e le calvarie sono state prelevate per l'esecuzione di analisi mediante microtomografia computerizzata (μCT) ex vivo.

Le informazioni microtomografiche sono state acquisite utilizzando uno scanner prodotto da *SkyScan NV*. Le immagini ricostruite presentano una matrice di acquisizione pari a 1944 × 1944 pixel e una dimensione del voxel di circa 21 μm in tutte e tre le direzioni spaziali. I valori di attenuazione HU hanno messo alla luce un *Rescale Intercept* di circa -1000 e un *Rescale Slope* dell'ordine di 50-60. Ciò implica che i valori di intensità vengono trasformati mediante una relazione lineare, nella quale l'*intercept* definisce il valore di riferimento iniziale, mentre lo *slope* determina l'incremento tra due livelli consecutivi. Di conseguenza, i valori di HU non risultano continui, ma assumono esclusivamente valori separati da intervalli pari al valore dello *slope*, producendo una distribuzione caratterizzata da incrementi costanti di circa 50-60 HU. Le informazioni tecniche relative alle acquisizioni sono state ricavate dai metadati DICOM associati alle scansioni μCT.

2.2. Gaussian Mixture Model

Per studiare i processi di riassorbimento del materiale protesico e di neoformazione ossea è necessario adoperare modelli statistici in grado di descrivere la distribuzione dei valori di HU all'interno del volume, con lo scopo di individuare differenti gruppi di voxel associati ai diversi materiali e/o tessuti costituenti la regione di interesse. La scelta del modello è ricaduta sulla *Gaussian Mixture Model*⁵⁴(GMM), ossia un modello probabilistico utilizzato per descrivere una dispersione di dati attraverso una combinazione di distribuzioni gaussiane.

L'idea alla base del modello è quella per la quale ogni distribuzione di dati può essere suddivisa in cluster definiti attraverso un profilo gaussiano. Per questo motivo si introduce una variabile latente discreta z che indica la gaussiana k di appartenenza. Ciascun dato (valore di HU) è associato ad una variabile latente z_i che assume valori in un intervallo tra 1 e K , dove K è il numero di gaussiane utilizzato nel modello⁵⁴. Ogni componente gaussiana possiede un peso π_k , ossia la probabilità che la variabile latente z_i assuma il valore k :

$$p(z_i = k) = \pi_k$$

Il peso rappresenta quindi la probabilità a priori che un generico dato appartenga alla k -esima componente gaussiana e ne descrive il contributo relativo all'interno del modello. La somma dei pesi di tutte le componenti è pari a 1.

Inizialmente i pesi vengono definiti dividendo il dataset in parti uguali (es. $k = 3$; $\pi_k = 0.33$).

Oltre ai pesi, ogni gaussiana è spiegata da una media μ_k e una varianza σ_k^2 che descrivono rispettivamente dove ricade il centro della gaussiana e quanto essa è larga⁵⁴.

A partire dai pesi π_k , medie μ_k e varianze σ_k^2 , il modello viene espresso con la seguente espressione:

$$p(x_i) = \sum_{k=1}^K \pi_k \mathcal{N}(x | \mu_k, \sigma_k^2)$$

$$\mathcal{N}(x | \mu_k, \sigma_k^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_k^2}} \exp\left(-\frac{(x - \mu_k)^2}{2\sigma_k^2}\right)$$

dove $\mathcal{N}(x | \mu_k, \sigma_k^2)$ rappresenta la k -esima distribuzione gaussiana descritta da media μ_k e varianza σ_k^2 . Il modello esplicitato descrive che: “dato un valore HU (x_i), per ogni gaussiana k viene calcolata la probabilità di osservare quel valore (sarebbe $\mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2) = p(x_i | z_i = k)$), quest'ultima viene moltiplicata per il peso della singola gaussiana (π_k) e viene sommato il contributo di tutte le k componenti”. L'output ricavato è perciò una probabilità che definisce quanto è probabile osservare quel dato sommando il contributo di tutte le gaussiane⁵⁴.

La fase preliminare del modello riguarda il calcolo di media e varianza di ogni k -gaussiana tramite un'analisi k -means, un modello di clustering utilizzato per suddividere un dataset minimizzando la distanza totale interna ai cluster⁵⁴.

La stima successiva dei parametri del modello (pesi, media e varianza) viene eseguita mediante un algoritmo di *expectation-maximization* (EM)⁵⁴, un metodo iterativo per stimare gli indici di

modelli statistici aventi variabili latenti. In particolare, l'algoritmo utilizzato nel presente lavoro prende avvio dalla fase di *expectation* nel quale vengono individuate le probabilità a posteriori, ossia la risposta alla domanda “dato il valore HU (x_i), quanto è probabile che provenga dalla gaussiana k ?”.

Successivamente, nella fase di *maximization* vengono ricalcolati i parametri media, peso e varianza di ogni gaussiana utilizzando le probabilità a posteriori e le formule matematiche di seguito mostrate:

$$\mu_k = \frac{\sum_{i=1}^N \gamma_{ik} x_i}{\sum_{i=1}^N \gamma_{ik}},$$

$$\pi_k = \frac{\sum_{i=1}^N \gamma_{ik}}{N}, \text{ dove } N \text{ è la numerosità campionaria;}$$

$$\sigma_k^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \gamma_{ik} (x_i - \mu_k)^2}{\sum_{i=1}^N \gamma_{ik}}.$$

Dai nuovi parametri viene quindi ricalcolata la $p(x_i)$ del modello e si ricava la verosomiglianza logaritmica, un indice che definisce quanto il modello fitta bene la distribuzione:

$$\log L = \sum_{i=1}^N \log p(x_i) .$$

Da qui, il ciclo EM viene ripetuto fino ad una quantità di iterazioni definita dall'utente (es. 1000) o fino al raggiungimento di una convergenza per il valore di verosomiglianza, ovvero una situazione nel quale il parametro varia da un'iterazione all'altra di una quantità inferiore ad una tolleranza. Alla chiusura del ciclo vengono ottenuti pesi, medie, varianze e verosomiglianza del modello. L'intera procedura viene inoltre ripetuta per un numero di replicazioni definito dall'utente al fine di ottenere la soluzione con la maggiore verosomiglianza possibile. Per il modello scelto, è stato sviluppato in seguito il calcolo del *Bayesian Information Criterion* (BIC)⁵⁴, indice di efficienza del modello che premia la capacità del metodo statistico adottato di rappresentare i dati nel miglior modo possibile, ma penalizza l'utilizzo di un alto numero di parametri:

$$BIC = -2 \log L + q \log N ,$$

dove q è il numero di parametri utilizzati.

Inversamente rispetto alla verosomiglianza, più basso è il valore del BIC e migliore è il modello⁵⁴.

È stato inoltre calcolato l'*Akaike Information Criterion* (AIC), indice analogo al BIC ma non penalizzante dell'alto numero parametrico e campionario. Pertanto, al BIC è stata data più rilevanza ai fini della tesi⁵⁴.

Giunti al calcolo degli indici di efficienza, il processo è stato riprodotto variando il numero di componenti gaussiane, ossia il parametro k ⁵⁴.

Il modello di GMM fa della sua massima forza le probabilità a posteriori poiché consentono di stimare quanto un determinato dato appartenga a ciascuna delle gaussiane del modello e permettono di determinare i parametri delle k -componenti, con più o meno precisione. In particolare, considerato un valore x_i , la probabilità a posteriori è in tal modo descritta:

$$\gamma_{ik} = p(z_i = k \mid x_i) = \frac{\pi_k p(x_i \mid z_i = k)}{\sum_{j=1}^K \pi_j p(x_i \mid z_i = j)} = \frac{\pi_k N(x_i \mid \mu_k, \sigma_k^2)}{\sum_{j=1}^K \pi_j N(x_i \mid \mu_j, \sigma_j^2)}.$$

Sulla base di quanto appena detto, viene da sé che ogni dato HU ha tante probabilità a posteriori tante quante sono le gaussiane del modello in esame e che la probabilità dipende sia dalla distanza del dato dalla componente normale sia dal peso relativo della distribuzione del modello complessivo. Tramite l'utilizzo delle probabilità a posteriori, la classificazione viene eseguita seguendo un pattern probabilistico e dunque un dato può presentare differenti gradi di appartenenza rispetto a più gaussiane⁵⁴.

2.3 Procedimento per l'analisi delle μ CT

I primi passi eseguiti nel lavoro di tesi si sono soffermati sulle analisi delle microtomografie murine per valutare la distribuzione tissutale all'interno delle cupole impiantate. Nell'ottica dell'analisi, sono stati sviluppati processi per l'estrazione delle informazioni radiologiche mediante l'utilizzo della GMM e la mesh ROI. Di seguito vengono indicate le metodologie procedurali utilizzate.

- Acquisizione delle immagini μ CT dei campioni murini, effettuata 8 settimane dopo l'impianto degli scaffold.
- Importazione delle immagini DICOM in *3D Slicer* e allineamento della μ CT al modello dello scaffold mediante markups opportunamente selezionati.
- Definizione della ROI corrispondente al volume interno della cupola e successiva estrazione dei valori di radiodensità.

- Implementazione di modelli GMM su *Matlab* utilizzando i valori estratti, al fine di classificare statisticamente i voxel presenti all'interno della ROI.
- Calcolo delle probabilità a posteriori di appartenenza di ciascun voxel alle componenti gaussiane individuate dal modello.
- Importazione dei risultati in *3D Slicer* e generazione di segmentazioni volumetriche tridimensionali corrispondenti alle diverse componenti identificate dal GMM.
- Estrazione dei parametri quantitativi di ciascun segmento, tra cui volume della componente, media e deviazione standard dei valori di radiodensità.
- Confronto dei modelli ottenuti variando il numero di componenti gaussiane, al fine di individuare la configurazione più rappresentativa della distribuzione dei dati.

Prima di procedere con la descrizione dettagliata del protocollo, si segnala che nelle appendici 7 e 8 sono riportati in modo più dettagliato e procedurale tutti i passaggi, le operazioni e i comandi eseguiti, al fine di consentire la riproduzione delle metodologie adottate e ripetere le analisi. Nell'appendice 6 sono invece raccolti i codici utilizzati nei diversi software, corredati dalle relative specifiche e indicazioni per il loro utilizzo.

2.3.1. Allineamento tra μ CT e mesh ROI

La prima tappa del lavoro è stato l'allineamento della ROI nelle immagini ottenute dai campioni murini. Questo in quanto la ROI è stata impiegata per l'estrazione successiva dei valori radiografici. Pertanto, è stato opportuno eseguire una prima osservazione qualitativa delle μ CT per comprendere come posizionarla correttamente. Le immagini sono state caricate nel software *3D Slicer* allo scopo di visualizzare e ispezionare il volume lungo il piano assiale, sagittale e coronale. Quanto acquisito viene rappresentato tradizionalmente mediante differenti livelli di grigio associati alla densità radiologica dei materiali attraversati dai raggi X. I rispettivi colori sono correlati ai valori di *Hounsfield Unit* (HU), una scala quantitativa utilizzata in tomografia computerizzata per definire l'attenuazione radiologica dei tessuti. Per comune convenzione, la scala viene impostata tenendo conto che l'aria possiede valore di -1000 HU e l'acqua 0 HU. Tessuti più densi possiedono quindi tipicamente valori positivi elevati⁵⁵.

Mirando a una migliore visualizzazione del volume, sono stati utilizzati gli strumenti di *window width/level* e *threshold*, comunemente impiegati nell'elaborazione delle immagini⁵⁵. La *window width/level* permette di modificare il contrasto e la luminosità selezionando uno specifico intervallo di HU. In particolare, la *window width* rappresenta la finestra di visualizzazione dei

voxel dentro al quale si ha la variazione del contrasto e luminosità, il *window level* è il centro della *window* e pertanto consente di traslarla lungo la scala degli HU⁵⁵. I valori di HU al di sotto del limite inferiore della *window* vengono completamente oscurati, quelli al di sopra del limite superiore vengono completamente schiariti. Il *threshold*, invece, consente di selezionare esclusivamente i voxel di interesse, ai quali viene applicata la *window width*⁵⁵. Questi strumenti vengono utilizzati poiché i tessuti presentano differenti valori di HU e dunque è possibile discriminarli e suddividerli (Fig.21).

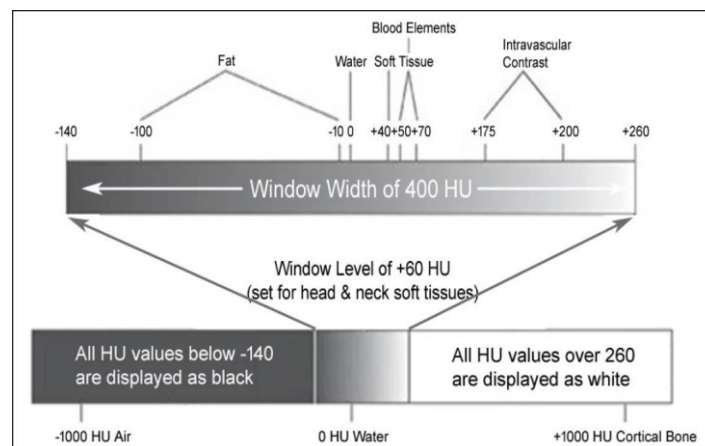


Figura 21: Window width e window level⁵⁵

Attraverso una prima analisi qualitativa delle immagini, è stato possibile identificare la morfologia del volume in esame e definire una regione di interesse da cui estrarre i valori di HU (Fig.22). Inoltre, utilizzando gli strumenti messi a disposizione per un'ottimale visualizzazione del volume, è emerso che le intensità di grigio legate agli HU presentavano un range compreso approssimativamente tra -1000 e circa 10300. Tale distribuzione risulta coerente con le informazioni ricavate in precedenza dai metadati DICOM delle μ CT, che riportano un *Rescale Intercept* pari a circa -1000 e un *Rescale Slope* dell'ordine di 60. Di conseguenza, i valori di HU risultano scalati rispetto alla convenzionale scala di misura e assumono incrementi discreti pari al valore dello slope adottato per la ricostruzione.

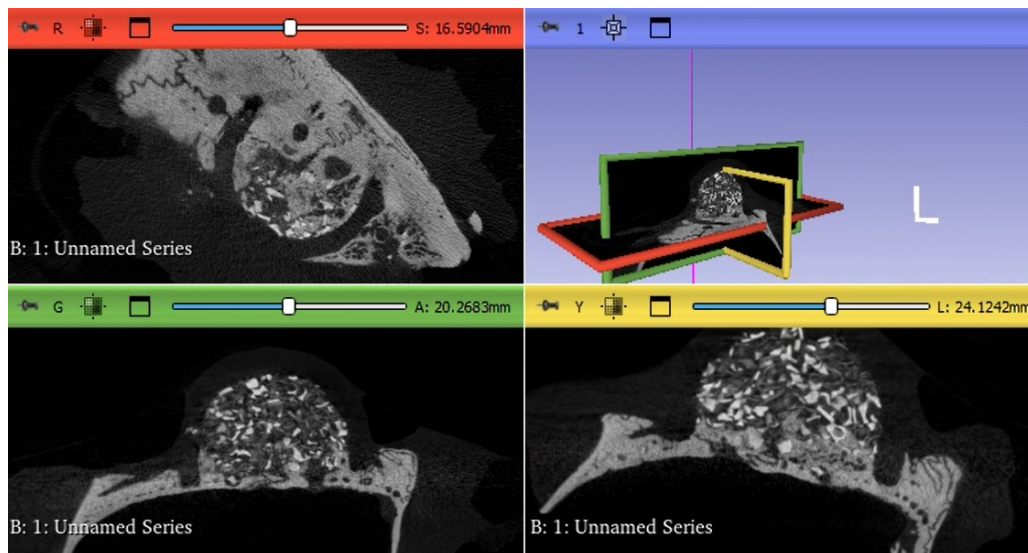


Figura 22: Rappresentazione di una CT murina con scaffold impiantato

A questo punto, è stato possibile comprendere come procedere con l'orientamento della ROI. Sono stati inizialmente effettuati diversi tentativi di posizionamento basati su landmark anatomici. Nello specifico, sono stati collocati manualmente punti di riferimento (*markups*) corrispondenti alla sommità della cupola dello scaffold, sia sulla *mesh* sia sul volume della μ CT. Successivamente è stato utilizzato il modulo “*Fiducial Registration*” di *3D Slicer* che consente di calcolare trasformazioni spaziali tramite matrici a partire da punti omologhi definiti dall'utente. Mediante tale procedura, i punti appartenenti alla *mesh* sono stati traslati nello spazio con l'obiettivo di sovrapporsi ai corrispondenti *markups* sulla CT. Nonostante diversi tentativi di posizionamento, l'allineamento ottenuto non risultava accurato. In particolare, la trasformazione generata tendeva a non essere precisa e non sicura in quanto la scelta delle posizioni spaziali dei punti sulla ROI erano scelte “a occhio”. Tale implicazione evidenziò la necessità di trovare una strategia più solida e robusta, basata su vincoli anatomici e spaziali distribuiti in prossimità della ROI, al fine di ottenere un corretto allineamento tra *mesh* e volume microtomografico.

In virtù dei primi tentativi, si è scelto di adottare una metodologia di allineamento basata su *landmarks* anatomico-geometrici ritenuti visivamente affidabili sugli elementi di studio. Nello specifico, l'attenzione è stata rivolta alla regione basale dello scaffold, ovvero alla zona di contatto tra lo scaffold e il tessuto osseo sottostante. Nella regione considerata, risultavano chiaramente visibili i contatti scaffold-tessuto osseo murino poichè la presenza della cupola aveva determinato la formazione di spigoli di appoggio non fisiologici e discontinuità tra valori di HU (Fig.23).

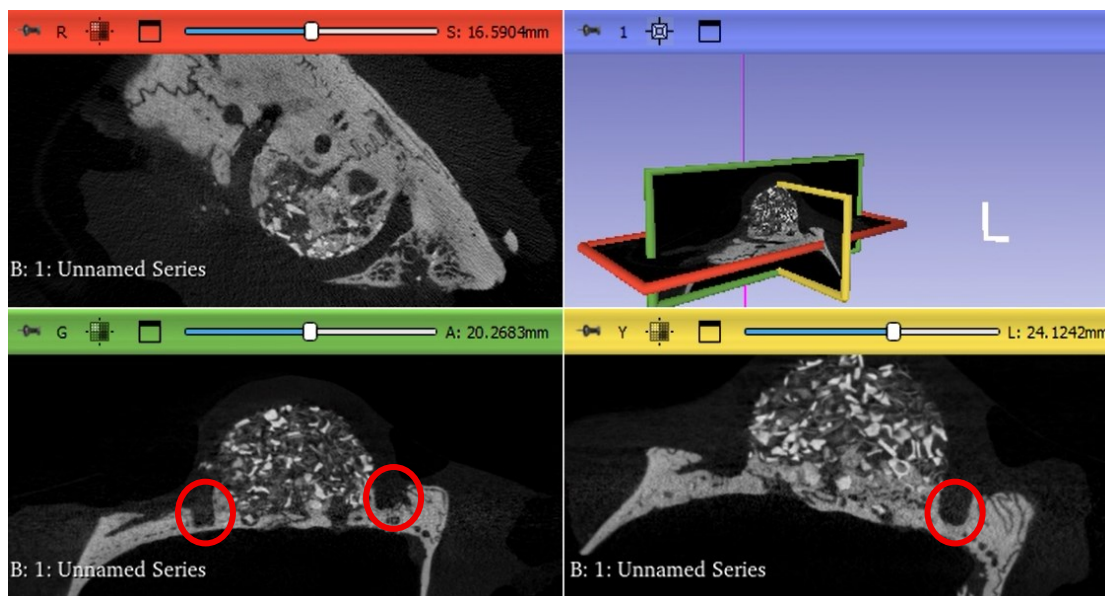


Figura 23: μ CT murina con evidenziate le regioni di contatto scaffold-tessuto osseo

Per individuare i riferimenti microtomografici descritti, le immagini sono state analizzate accuratamente nei differenti piani di visualizzazione (assiale, sagittale e coronale), localizzando siti chiaramente riconoscibili. Di conseguenza, i markups sono stati posizionati in corrispondenza di queste zone ritenute visivamente sicure, ovvero vertici in cui la corrispondenza tra *mesh* e μ CT risultava evidente. Detta procedura è stata adoperata e ripetuta su tutto il volume della μ CT con l'intento di distribuire i nodi di riferimento e ottimizzare il successivo allineamento. Essendo considerate solamente le corrispondenze sicure, in alcune μ CT è stato possibile distribuire i *landmarks* in modo omogeneo sulla base, in altre non è stato possibile in quanto la posizione del punto sarebbe stata incerta, causando un erroneo allineamento (Fig.24). In ogni caso, il numero di landmarks necessari è dell'ordine di una ventina di punti, un numero ritenuto sufficiente per definire correttamente la geometria della base dello scaffold e garantire un allineamento affidabile tra la mesh e il volume microtomografico.

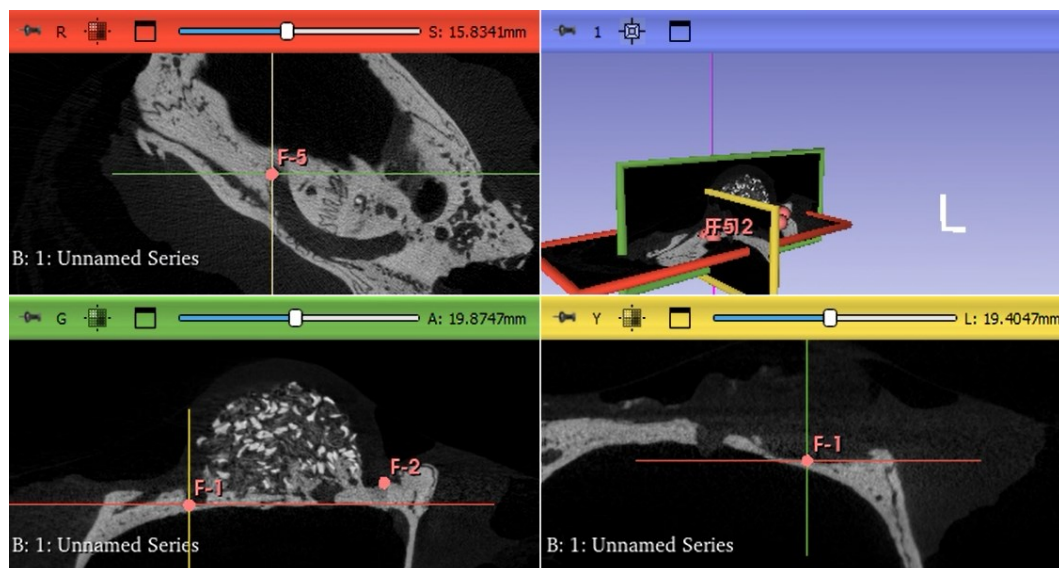


Figura 24: μ CT murina e i landmarks posizionati in zone visivamente sicure

Una volta posizionati i *landmarks*, questi sono stati ricontrollati manualmente con lo scopo di verificare la corretta posizione degli stessi. In seguito, i punti selezionati sono stati esportati all'interno di una tabella contenente le relative coordinate spaziali. Tali coordinate sono state salvate secondo il sistema di riferimento *Left-Posterior-Superior* (LPS), utilizzato nell'ambito dell'imaging medico e nella gestione dei dati DICOM. Lo specifico sistema spaziale è stato scelto a discapito del *Right-Anterior-Superior* (RAS) poiché i nodi all'interno della tabella sono stati importati in seguito nel software *Rhinoceros 3D*, il quale presenta un sistema di riferimento omologo a quello designato. In tal maniera, è stata consentita la ricostruzione spaziale dei punti precedentemente identificati in *3D Slicer*.

In un secondo momento, oltre ai punti, è stata importata all'interno del software *Rhinoceros 3D* anche la mesh ROI, con l'obiettivo di procedere all'allineamento. Per eseguire quest'ultimo, è stato inizialmente realizzato un cerchio interpolato ai nodi importati. In tal maniera, la figura geometrica sviluppata è stata capace di adattarsi nello spazio ai punti di interesse e di conseguenza di rappresentare con buona precisione la base dello scaffold osservato dalle μ CT (Fig.25). Dopodiché, l'adattamento spaziale è stato eseguito tramite tre punti appartenenti sia alla base circolare della ROI sia al cerchio interpolato: il centro e due punti sulla circonferenza che individuano un settore circolare delimitato da due raggi perpendicolari tra loro. L'output ottenuto è una sovrapposizione della base della *mesh* con il cerchio costruito (Fig.25).

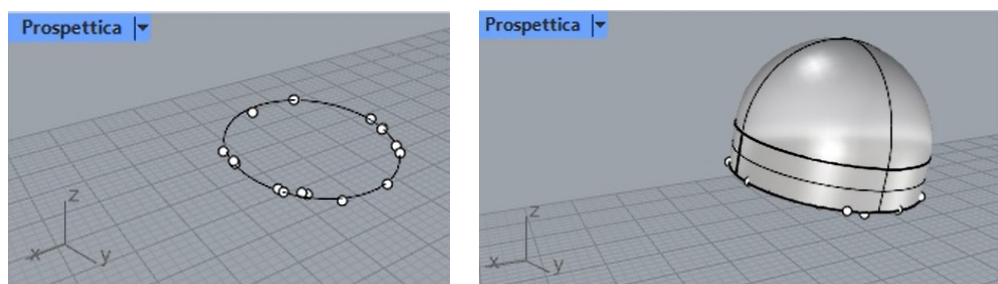


Figura 25: Cerchio interpolato tra i punti e mesh post allineamento

A questo punto, la cupola è stata esportata dal software in formato stl consentendo di mantenere le coordinate. Inoltre, avendo due sistemi di riferimento congruenti tra i due software, l'allineamento risultava mantenuto. Difatti, la ROI appena salvata è stata caricata nel software *3D Slicer*, ne è stata attivata la visualizzazione bidimensionale sui piani della μ CT ed è emerso che l'orientamento è risultato coerente con la posizione dello scaffold osservabile sulle μ CT (Fig.26).

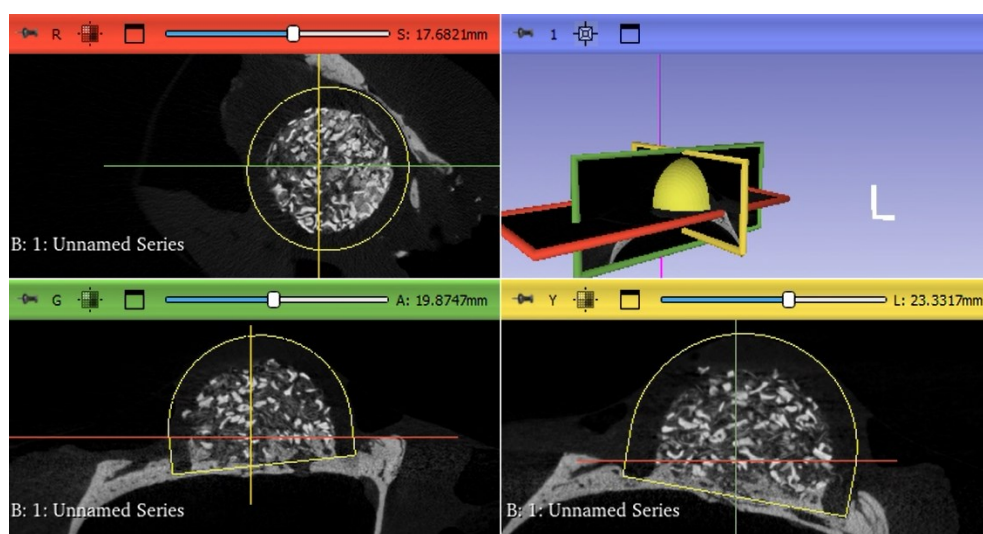


Figura 26: μ CT e ROI accuratamente allineata con il volume di interesse

Tuttavia, è doveroso evidenziare che il raggiungimento di una perfetta corrispondenza sia un obiettivo di difficile raggiungimento nelle procedure di trasformazione manuale. Un allineamento perfettamente accurato necessiterebbe di avere un numero molto elevato di *landmark* distribuiti nello spazio in modo uniforme e con una notevole precisione all'interno delle immagini. Difatti, l'allineamento è risultato coerente ma non abbastanza preciso e all'interno della ROI venivano considerati voxel non appartenenti alla cupola (Fig.27)

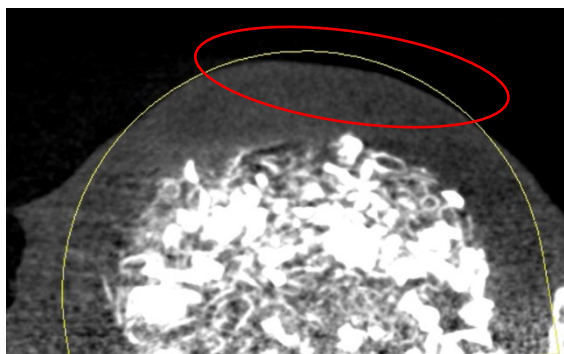


Figura 27: Dettaglio sulla ROI e dei voxel erroneamente compresi, indicati dalla regione rossa

Al fine di risolvere questa problematica, è stato eseguito su *Rhinoceros 3D* un *offset* della mesh verso l'interno. Tale operazione ha permesso di considerare una porzione più interna della cupola e, di conseguenza, escludere la componente mostrata in figura 27 (Fig.28).

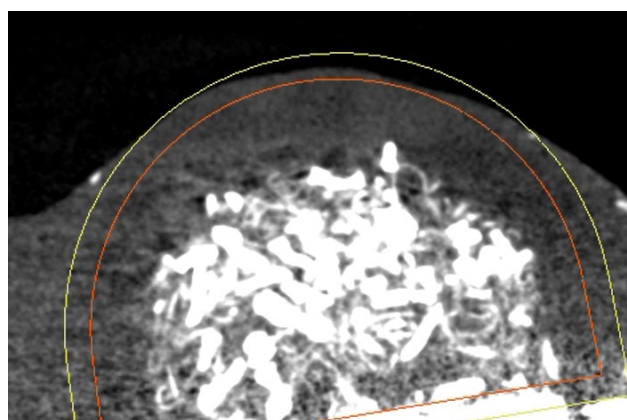


Figura 28: Confronto tra mesh con offset (in rosso) e mesh senza offset (in giallo)

2.3.2. Estrazione dei valori di HU

Conclusa la fase di allineamento, lo step successivo è stato implementato mediante l'utilizzo della console *Python* integrata all'interno di *3D Slicer*, per eseguire operazioni di elaborazione ed estrazione dei dati contenuti nelle μ CT. Nel dettaglio, questo approccio è stato seguito per ricavare informazioni relative ai valori di HU contenuti esclusivamente all'interno della ROI.

L'utilizzo della console di *Python* si è reso necessario alla luce del fatto che le procedure implementabili tramite gli strumenti inseriti all'interno del software, come i moduli "*Segment*

editor” e “*Mask Volume*”, risultavano computazionalmente troppo pesanti per il tipo di file utilizzato. Quanto detto è stato inizialmente provato, ma adoperando delle μ CT di dimensioni particolarmente elevate e contenenti elevate quantità di informazioni, il software non reggeva ed entrava in uno stato di “*out of memory*” (RAM non sufficiente per il compito in esecuzione) o si interrompeva improvvisamente. Pertanto, si è reso necessario procedere tramite degli script di Python che hanno consentito di ridurre il peso a carico della RAM. Ciononostante, in alcune occasioni, lo stato di “*out of memory*” si presentava in ogni caso, ed era dunque opportuno ripulire la RAM da eventuali operazioni superflue in esecuzione.

Il primo codice utilizzato, riportato nell’Appendice 6.A.1, ha permesso di ottenere una regione segmentata e limitata esclusivamente ai voxel appartenenti alla mesh ROI. Il secondo algoritmo, mostrato in appendice 6.A.2, ha riguardato invece l’acquisizione del numero di voxel per ciascun valore di HU all’interno della regione segmentata. A tal scopo, è stata creata una tabella destinata a contenere due colonne: una per la lista dei valori di HU e l’altra per il rispettivo numero di voxel per ciascun HU. Con l’ausilio di questa metodologia, è stata ricavata una distribuzione quantitativa delle misure di attenuazione radiologica.

Per approfondimenti relativi ai codici menzionati, si rinvia alle relative appendici.

2.3.3. GMM su Matlab

Giunti a questo punto, è stato possibile estrarre i valori di interesse dalle μ CT grazie alle metodologie adottate. I dati ricavati risultavano perciò pronti per le analisi statistiche successive.

Per procedere con le analisi statistiche, le informazioni ottenute sono state importate sul software *Matlab*, strumento utile ai fini statistici. L’elaborazione dei dati è stata eseguita tramite la GMM, in precedenza descritta nella sezione “*Materiali e metodi*” (2.2). I valori estratti da *3D Slicer* sono stati utilizzati come input del modello, così da ottenere le differenti componenti radiologiche associate a diverse distribuzioni normali.

Il primo codice utilizzato in ambiente *Matlab*, riportato nell’Appendice 6.B.1, è stato impiegato per analizzare la distribuzione dei valori di HU all’interno della ROI mediante la costruzione del relativo istogramma. Tale grafico ha consentito di riconoscere la presenza di un’alta variabilità tra i valori di densità radiografica, suggerendo la coesistenza di tessuti con caratteristiche radiologiche diverse (Fig.29). Successivamente, nello stesso codice, è stato modellato il *Gaussian Mixture Model* (GMM), valutando differenti configurazioni del modello

in base al numero di gaussiane. Il suo sviluppo ha restituito le gaussiane, coi rispettivi parametri, sovrapposte alla distribuzione originale (Fig. 30).

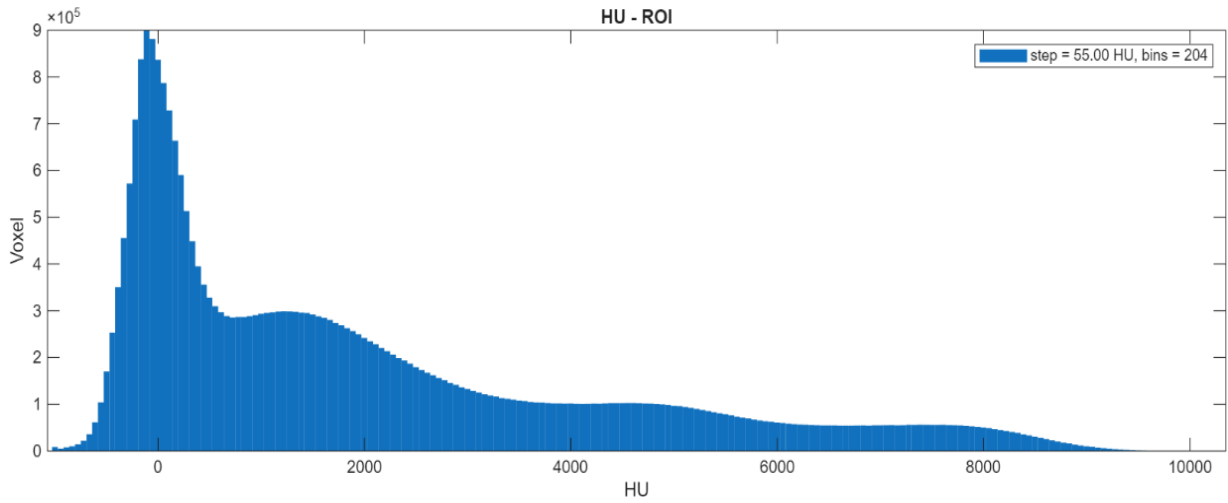


Figura 29: Istogramma preliminare di una μ CT; in legenda in ordine: step tra un bin e l'altro, numero di bins.

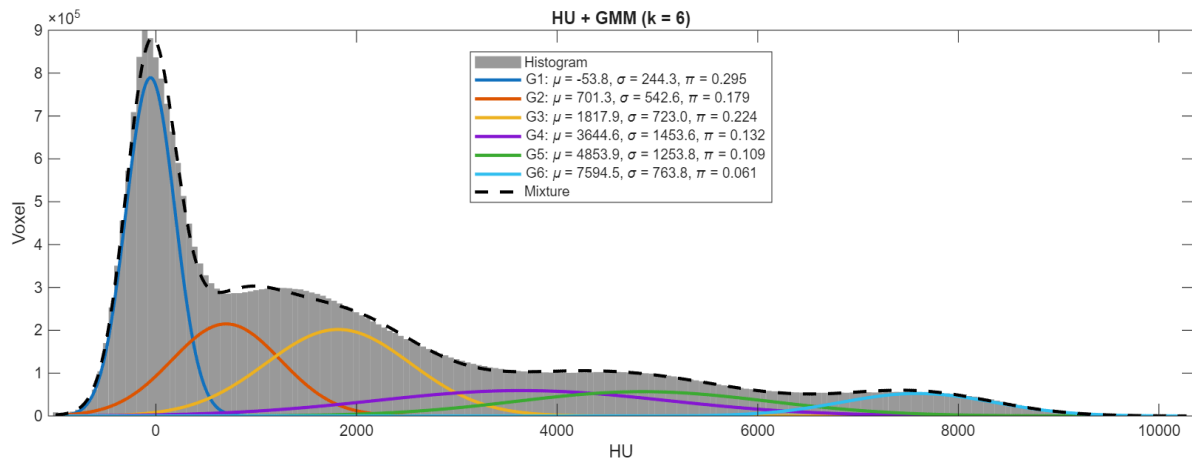


Figura 30: Esempio di istogramma della distribuzione a cui sono sovrapposte le K -gaussiane con i relativi parametri espressi in legenda.

Infine, per valutare il modello statistico, sono stati calcolati gli indici BIC, AIC e verosomiglianza logaritmica. Sulla base di quanto definito nella sezione “Materiali e metodi” ed essendo a conoscenza della grande dimensione del dataset, è stato sviluppato un plot dell’indice bayesiano e della verosomiglianza logaritmica per ogni K .

Per i dettagli e le specifiche del codice si rimanda all’Appendice 6.B.1; mentre per i molteplici grafici di una μ CT presa da esempio, si rinvia ai risultati (Cap.4), adibito ai commenti ed osservazioni sulle analisi.

2.3.4. Calcolo delle probabilità a posteriori

Nonostante quanto eseguito finora, le sole rappresentazioni grafiche non sono sufficienti a definire delle considerazioni attendibili. Dunque, si è effettuato un passo successivo per creare segmenti volumetrici su *3D Slicer* a partire dalle suddivisioni statistiche ottenute.

Con tale obiettivo, è stata utilizzata la metodologia basata sul calcolo delle probabilità a posteriori associate ai modelli GMM, tenendo conto di modelli aventi K compreso tra 4 e 8. I modelli aventi K inferiore di 4 sono stati esclusi in quanto riportavano delle rappresentazioni troppo semplificate della separazione delle componenti radiologiche presenti all'interno della ROI. Per ottenere una classificazione più robusta senza avere delle assegnazioni ambigue dei voxel, è stata introdotta una classe "incerta", nella quale sono stati inseriti i voxel aventi una differenza inferiore al 2,5% fra la probabilità a posteriori maggiore e la seconda probabilità più elevata. Tale categoria identifica i voxel caratterizzati da una probabilità di appartenenza tra due gaussiane troppo simile, rendendo non affidabile la loro classificazione.

Lo *script* utilizzato, inserito in appendice 6.B.2, ha permesso di ricavare, per ogni valore di HU, la probabilità di appartenenza rispetto a ciascuna componente gaussiana del modello e determinare una classe incerta. Come per gli altri codici, si rimanda alla sezione relativa per informazioni dettagliate.

2.3.5. Creazione dei segmenti volumetrici su 3D Slicer

Fatto ciò, il passaggio seguente è stato l'importazione in *3D Slicer* dei risultati del calcolo delle probabilità a posteriori e la creazione di nuovi segmenti nel volume microtomografico. Questi ultimi, sono stati realizzati in modo che ciascuno rappresentasse una componente gaussiana. Per questa fase in *3D Slicer*, come per la fase di segmentazione ed estrazione dei valori di HU dalla ROI, è stato necessario ricorrere alla console di *Python*, a causa delle ragioni già esplicitate in precedenza.

Il codice utilizzato, riportato in dettaglio nell'Appendice 6.A.3, ha assegnato ciascun voxel alla relativa gaussiana sulla base delle associazioni tra valori di HU e classi individuate, generando i corrispondenti segmenti all'interno della μ CT. Tramite questo procedimento, è stata potuta ottenere una classificazione statistica spaziale dei voxel, mantenendo la posizione dei segmenti rispetto alle μ CT (Fig.31).

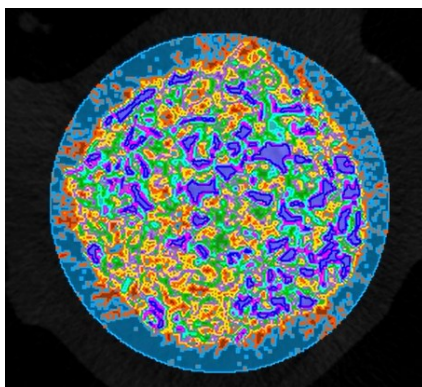


Figura 31: Esempio di segmento volumetrico su 3D Slicer (K=8)

In seguito, al fine di ottenere i dati relativi ai singoli segmenti, è stato utilizzato il modulo “*Segment Statistics*”, un tool utile per estrarre informazioni quantitative da una segmentazione. Nel nostro caso, per ogni segmento sono stati ricavati il volume e i principali dati statistici relativi agli HU, tra cui media, minimo, massimo e deviazione standard. Inoltre, tramite il rapporto tra il volume di ciascun segmento e il volume totale della ROI, sono state calcolate le percentuali volumetriche dei diversi segmenti all'interno della cupola.

Per i risultati di una μ CT d'esempio e i commenti, si rimanda ai risultati (Cap.4).

3. MATERIALI E METODI: protocollo di modellazione di una gabbia paziente specifica per la rigenerazione ossea

Come già introdotto, le analisi microtomografiche dei campioni rappresentano un sistema sperimentale sviluppato con l'obiettivo finale di trasferire il medesimo approccio ad un caso clinico reale. Per tale motivo, parallelamente alle analisi delle μ CT, è stata sviluppata una procedura di modellazione geometrica finalizzata alla progettazione di una gabbia personalizzata per la rigenerazione del tessuto osseo alveolare. Il workflow è stato applicato ad un caso clinico reale di difetto osseo alveolare, a partire da immagini tomografiche del paziente, con l'obiettivo di ottenere un modello virtuale del dispositivo, pronto per la successiva fabbricazione mediante stampa 3D in materiale polimerico biorassorbibile. La sequenza operativa ha previsto la creazione del modello anatomico del difetto in *3D Slicer*, lo sviluppo di una mesh di base bidimensionale in *Geomagic Design X* mediante due differenti approcci e la successiva realizzazione della gabbia tridimensionale in *Rhinoceros 3D*, sfruttando l'applicazione integrata *Grasshopper*.

3.1. Sviluppo di un modello anatomico del difetto

L'attività iniziale per la modellazione della gabbia è stata l'importazione della tomografia computerizzata del paziente all'interno di *3D Slicer*. La scansione ha rappresentato la base per tutte le successive operazioni sviluppate nel workflow. Come primo passaggio, è stata eseguita un'analisi qualitativa del volume tomografico, al fine di comprendere la morfologia del tessuto osseo e identificare la regione dove la discontinuità ossea si presentava (Fig.32).

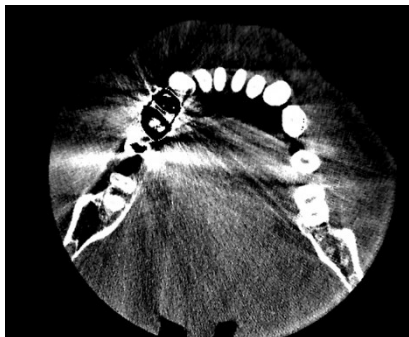


Figura 32: Immagine radiografica preliminare del caso clinico

L'osservazione sui tre piani ha consentito di analizzare la struttura anatomica obiettivo e di valutare una prima posizione del difetto osseo su diverse prospettive. In particolare, sono stati utilizzati gli strumenti di *window width*, *window level* e *threshold*, già utilizzati in precedenza, per una migliore visualizzazione. La combinazione di questi tool ha reso possibile l'individuazione precisa del difetto, nonché la sua estensione e morfologia (Fig.33). Questa fase preliminare ha gettato le basi per le successive.

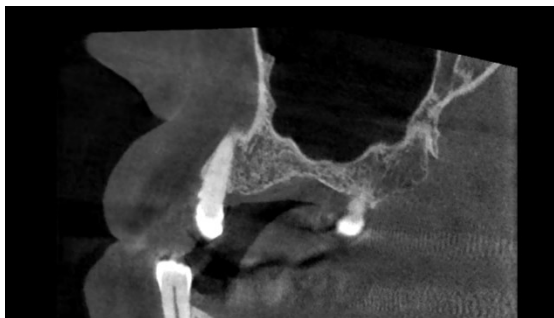


Figura 33: Individuazione del difetto osseo

Successivamente all'individuazione del problema osseo, si è proceduto alla creazione di una ROI mediante lo strumento "*Crop Volume*" disponibile nell'interfaccia del software. Questo step è stato eseguito con l'obiettivo di isolare il difetto osseo e di avere un'osservazione più facilitata dell'area. Inoltre, ha permesso di ottenere vantaggi dal punto di vista computazionale e operativo per le successive lavorazioni. Nel caso clinico preso in esame, il difetto osseo risultava localizzato nell'arcata mascellare superiore sinistra, in prossimità dell'area premolare, caratterizzata dall'assenza dei corrispondenti elementi dentari. La lacuna era chiaramente visibile, in quanto caratterizzata da una configurazione ossea alterata e una rientranza anomala.

Il volume ritagliato nell'area descritta è stato poi utilizzato per la creazione di un nuovo segmento, in modo da permettere le prime operazioni di pulizia e di ottimizzazione geometrica mediante gli strumenti disponibili su *3D Slicer*. Nel dettaglio, sono stati utilizzati comandi come "*Keep selected island*", per mantenere solamente una componente selezionata ed eliminare parti non comunicanti con essa, "*Smoothing*", per regolarizzare la superficie del segmento, e "*Closing holes*" per chiudere eventuali fori indesiderati sulla *mesh*. Con le metodologie descritte è stato possibile generare una rappresentazione tridimensionale e pulita del tessuto osseo target (Fig.34)

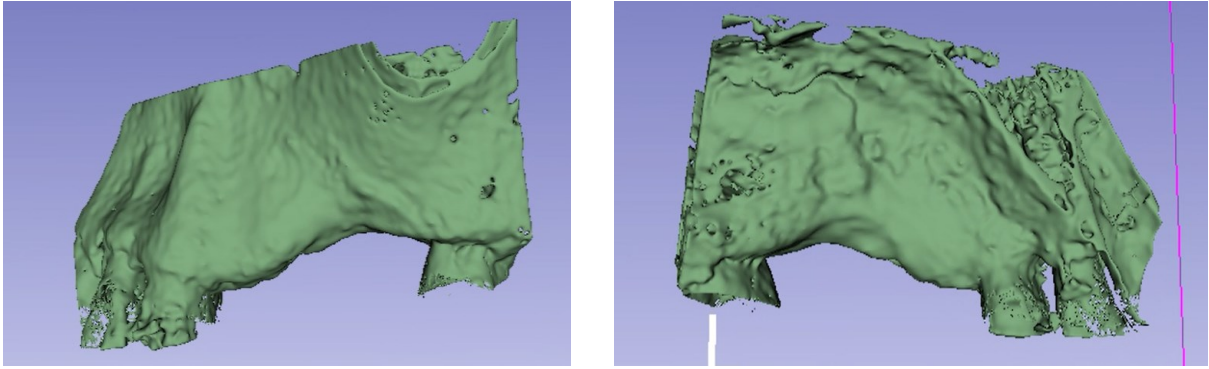


Figura 34: Rappresentazione del modello anatomico

Il segmento così ottenuto è stato esportato infine sotto forma di mesh tridimensionale. Tale mesh ha costituito la base di riferimento sulla quale è stata disegnata ed elaborata la gabbia personalizzata per la rigenerazione ossea guidata sui software *Geomagic Design X* e *Rhinoceros 3D*.

Per la creazione della gabbia sono stati ipotizzati due approcci differenti, entrambi ritenuti validi alla progettazione finale.

3.2. Creazione della mesh di partenza per la gabbia

3.2.1. Primo approccio

Il primo metodo studiato si basa sull'utilizzo delle superfici, scelte per la loro capacità di adattarsi alla morfologia della mesh e di essere facilmente modificate. In questo contesto, è stata inizialmente definita una regione della mesh in corrispondenza del difetto osseo mediante selezione manuale dell'area di interesse (Fig.35a). Successivamente, tramite il comando "*Loft Wizard*" (Fig.35b), è stata generata una superficie costituita da curve guida, chiamate loft, e relativi punti di controllo. Questi ultimi consentono di modificare la forma della superficie e delle loft associate, favorendo la personalizzazione della geometria finale. A tal fine, i control points sono stati traslati lungo la direzione normale alla mesh per ottenere una struttura in grado di racchiudere il volume mancante (Fig.35c). Per garantire il corretto adattamento alla morfologia anatomica, gli estremi delle loft sono stati vincolati alla mesh di partenza (Fig.35d).

Una volta ottenuta la geometria preliminare, la superficie è stata rifinita mediante la tracciatura di spline tridimensionali sulla mesh (Fig.35e), utilizzate come riferimento per il successivo comando "*Trim Surface*", impiegato per il taglio delle superfici e la rimozione delle porzioni

indesiderate. Al termine di questa fase è stata ottenuta una superficie personalizzata e adattata alla geometria del difetto (Fig.35f). Infine, la superficie è stata convertita in mesh, così da ottenere una struttura idonea agli step successivi del processo (Fig.35g).

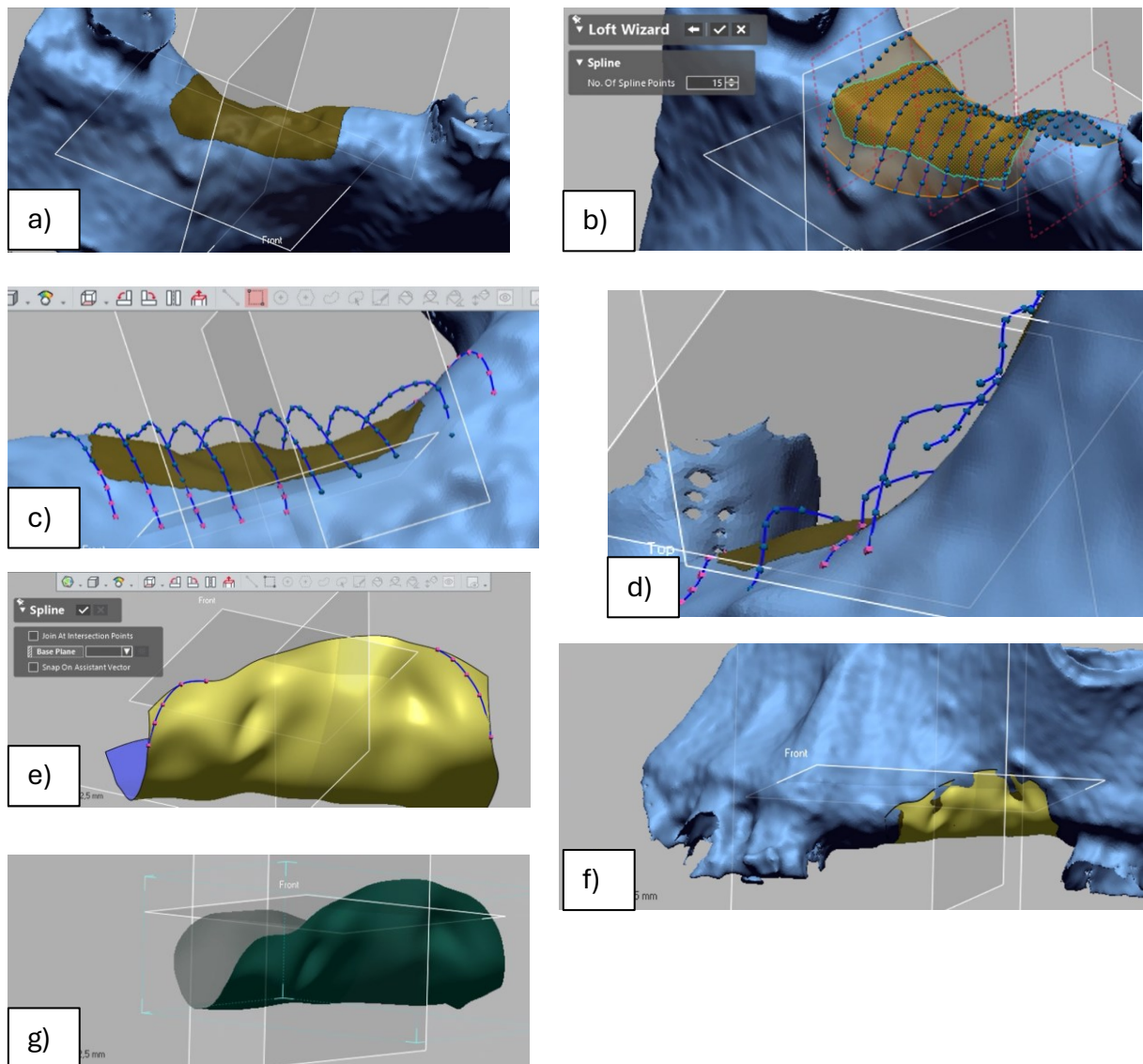


Figura 35: Rappresentazioni grafiche del primo approccio: Insert della regione (a); Loft Wizard (b); modifica delle Loft (c); comando Project (d); ritaglio della superficie (e); visione d'insieme (f); mesh della gabbia (g)

3.2.2. Secondo approccio

Il secondo approccio si basa principalmente sull'esecuzione di tagli sulla mesh anatomica e trova il suo elemento centrale nell'utilizzo del comando *"Fill Holes"*, impiegato per generare automaticamente una nuova porzione di mesh.

Rispetto al primo approccio, è stata introdotta una fase opzionale di isolamento della regione anatomica di interesse. In particolare, è stato realizzato uno sketch bidimensionale, successivamente estruso e convertito in mesh, così da poter essere utilizzato come strumento di taglio booleano della mesh di partenza. Questo passaggio ha permesso di eliminare le aree esterne non rilevanti e di isolare la porzione anatomica desiderata (Fig.36a).

Sulla mesh risultante si sono svolti i passaggi successivi, basati principalmente sull'utilizzo del comando *"Trim"*, impiegato per il ritaglio e il perfezionamento delle geometrie. In dettaglio, è stata tracciata una spline tridimensionale sulla geometria in modo da delimitare la regione corrispondente al difetto osseo (Fig.36b). La spline è stata quindi utilizzata come strumento di taglio per ottenere due porzioni distinte: la parte relativa al difetto e la restante mesh, caratterizzata dalla presenza di un foro (Fig.36c). Quest'ultimo è stato successivamente chiuso mediante il comando *"Fill Holes"*, che ha generato automaticamente una nuova porzione di mesh (Fig.36d).

La stessa spline è stata poi utilizzata per isolare la parte di mesh generata da *"Fill Holes"*, destinata a costituire la base della futura gabbia (Fig.36e). Prima di tale passaggio, è stata eseguita però un'operazione booleana di unione tra la superficie generata automaticamente e la porzione di struttura rappresentante il difetto osseo, così da ottenere una geometria maggiormente adattata alla morfologia anatomica e caratterizzata da un contatto più uniforme con la struttura originale (Fig.36f).

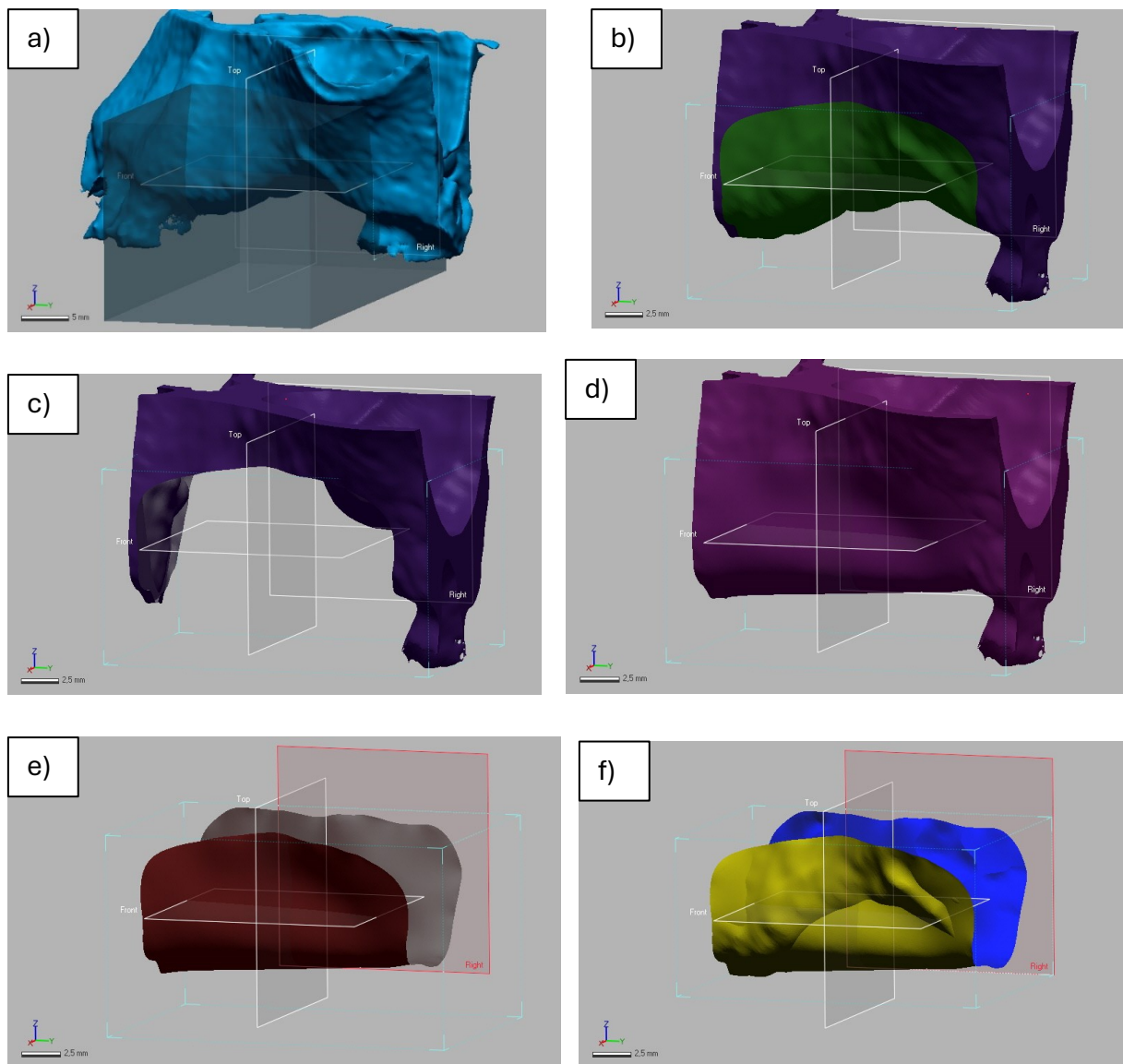


Figura 36: Rappresentazioni grafiche del secondo approccio: prisma di taglio della mesh anatomica (a); suddivisione della mesh anatomica nelle sue due parti (b); rappresentazione della parte esterna al difetto (c); Fill Holes (d); patch del buco (e); sovrapposizione della mesh anatomica e della patch (f)

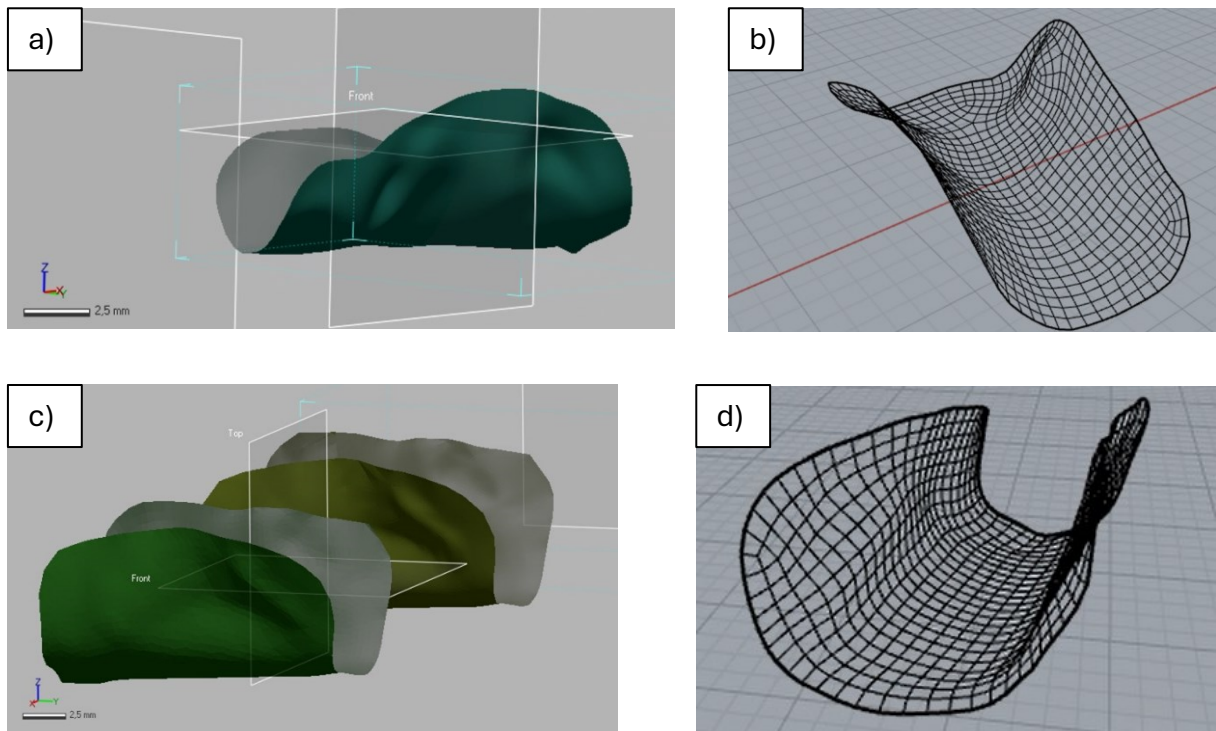


Figura 37: Risultati dei due approcci: primo approccio (a,b); secondo approccio (c,d)

3.3. Realizzazione della gabbia tridimensionale

Dopo aver ottenuto la mesh mediante uno dei due metodi precedentemente descritti, il modello è stato importato in *Rhinoceros 3D* e inserito in un progetto sviluppato in *Grasshopper*. La prima fase ha previsto due operazioni di “*TriRemesh*”, finalizzate alla riorganizzazione della mesh tramite una nuova triangolazione, definita in funzione della lunghezza degli elementi e del numero di iterazioni desiderato.

Successivamente, i comandi “*wbDual*” e “*wbFrame*” hanno convertito la mesh triangolare in una struttura poligonale duale e ne hanno generato il telaio. Attraverso il parametro “*Frame Size*” è stato possibile controllare lo spessore degli elementi strutturali e le dimensioni delle aperture della futura gabbia.

I bordi della struttura sono stati quindi estratti mediante “*Mesh Edges*” e “*Join*”, mentre la sequenza di comandi successiva, costituita da “*List Item*”, “*Explode*”, “*End Points*”, “*Curve Closest Point*”, “*Entwine*”, “*Flip*” e “*ConMesh*”, è stata utilizzata per generare una mesh corrispondente al bordo esterno della geometria. Tale componente è stata poi unita tramite “*MeshJoin*” alla struttura interna, ricavata in precedenza da “*wbDual*” e “*wbFrame*”. Il risultato finale è una singola mesh forata (Fig.38a).

Infine, i comandi “*wbThicken*”, “*wbSplitQuads*” e “*wbCatmullClark*” sono stati impiegati rispettivamente per assegnare uno spessore alla mesh, aumentarne la regolarità e smussarne gli spigoli, ottenendo una struttura tridimensionale continua e adattata alla morfologia anatomica (Fig.38b).

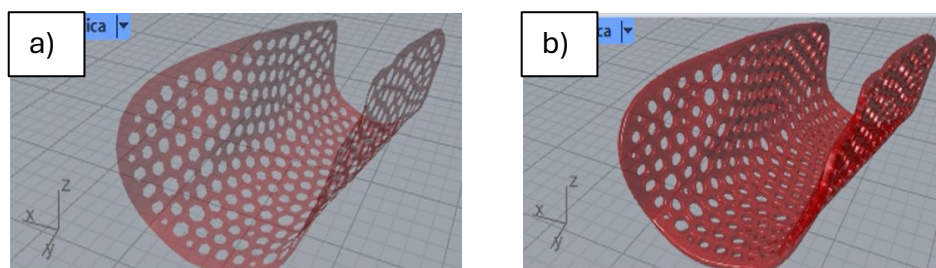
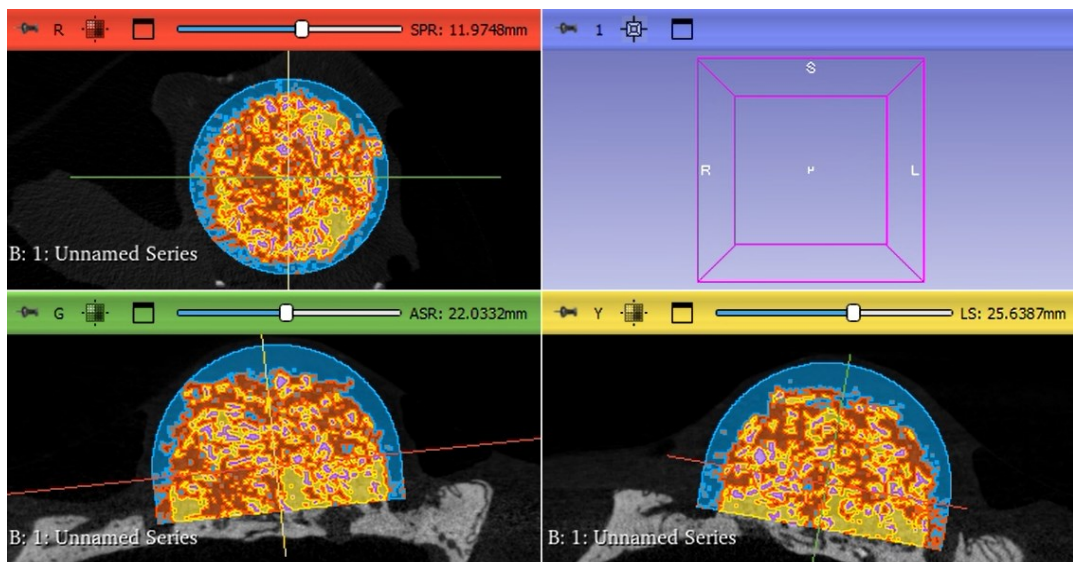
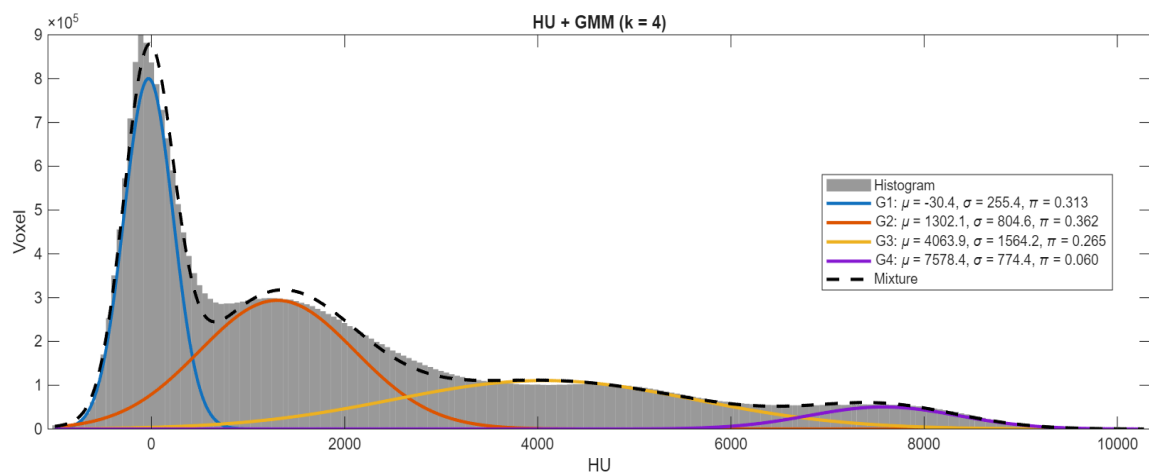
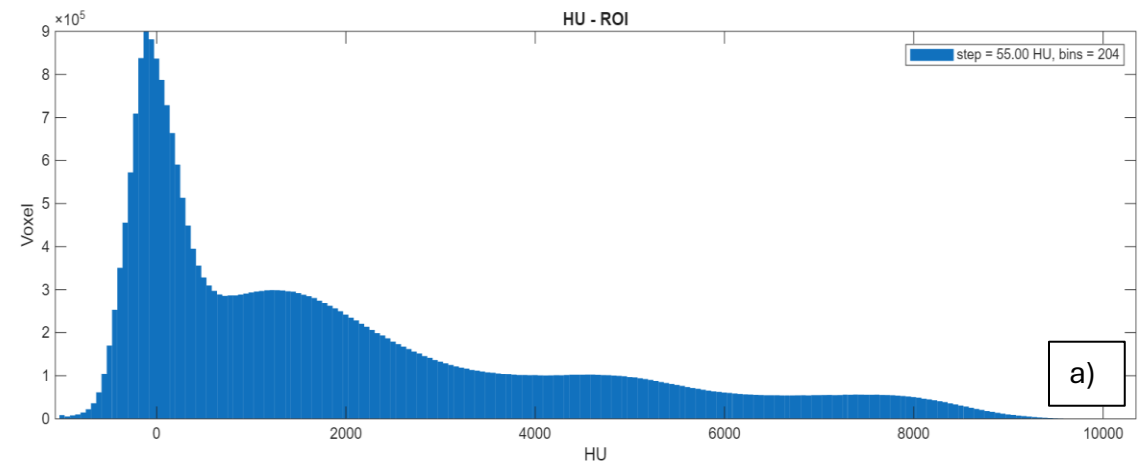


Figura 38: Output del workflow su Grasshopper; mesh bidimensionale (a); mesh conclusiva (b)

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

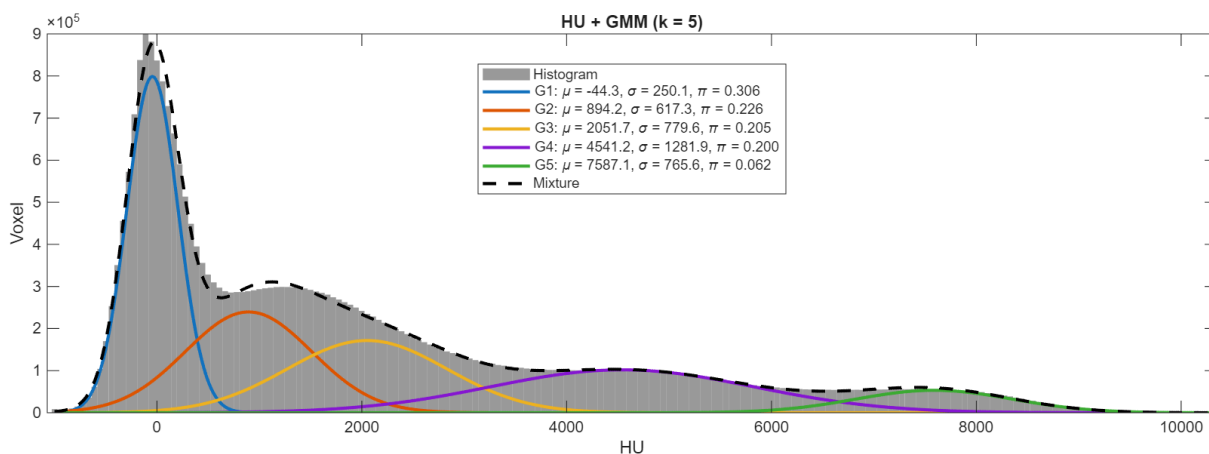
A seguito delle analisi condotte sulle μ CT, vengono di seguito presentati i risultati relativi a uno dei campioni analizzati, scelto come esempio rappresentativo. Per tale campione sono riportati i risultati ottenuti mediante il modello GMM considerando un numero di componenti gaussiane K compreso tra 2 e 8, unitamente alla distribuzione dei valori di HU rilevati all'interno della regione di interesse.

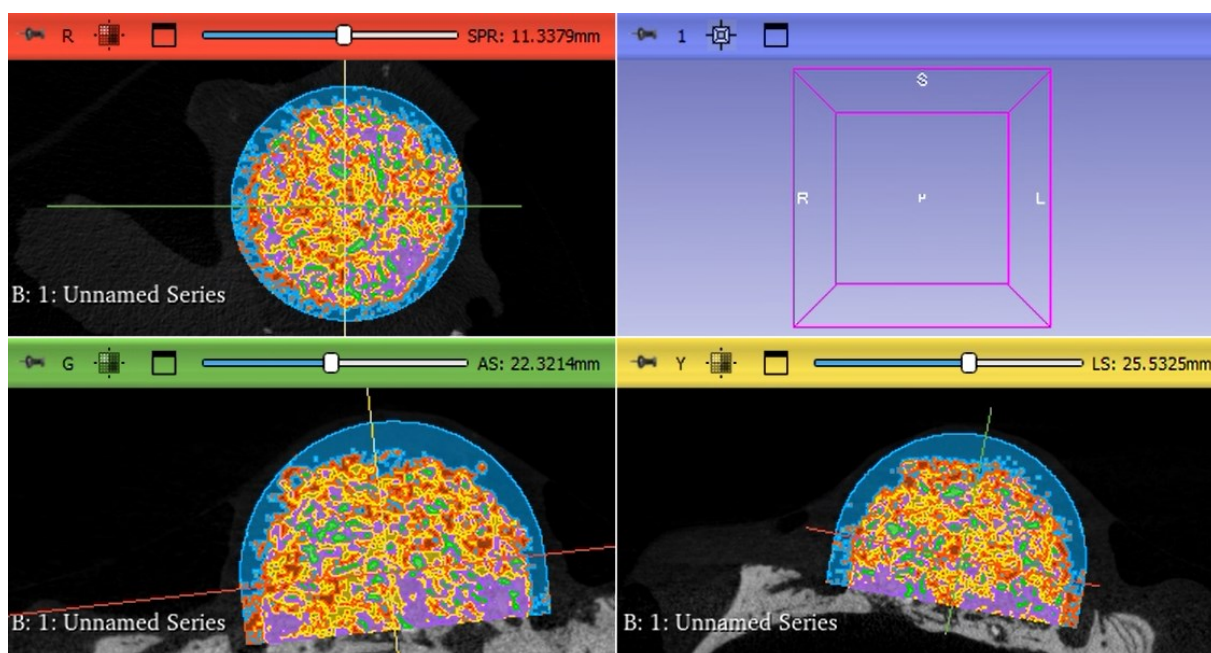


Segmento	Volume_mm3	Percentuale	Minimum (HU)	Maximum (HU)	Mean (HU)	StandardDeviation (HU)
ROI	275,5260	100,00	-1000,00	10276,00	1992,02	2322,95
INCERTO	0,5027	0,18	6721,02	6721,02	6721,02	NaN
G1	95,6935	34,73	-777,81	388,67	-41,33	239,89
G2	98,4104	35,72	-1000,00	2610,55	1421,30	629,88
G3	63,9188	23,20	2666,10	6665,47	4352,94	1131,16
G4	17,0003	6,17	6776,57	10276,00	7724,74	618,40

Figura 39: Istogramma della distribuzione(a); K = 4 istogramma con le gaussiane sovrapposte, segmenti volumetrici e risultati delle analisi volumetriche

L'analisi GMM a quattro componenti mostra una classificazione efficace dei voxel della cupola, con una quota di voxel incerti molto ridotta (0,18%), indice di un'elevata affidabilità nell'assegnazione alle diverse componenti gaussiane. Le componenti G1 e G2 risultano predominanti, costituendo complessivamente oltre il 70% del volume analizzato. In particolare, G1 è caratterizzata da una media molto bassa (-41 HU) e da una deviazione standard contenuta, risultando compatibile con il materiale polimerico PCL. Tale interpretazione è supportata anche dall'osservazione dei segmenti volumetrici ottenuti in 3D Slicer, la cui distribuzione spaziale risulta coerente con le regioni occupate dal materiale polimerico all'interno della cupola. Le componenti successive presentano valori HU progressivamente più elevati e una maggiore eterogeneità interna, suggerendo la presenza di tessuti con differenti gradi di mineralizzazione.





Segmento	Volume_mm3	Percentuale	Minimum (HU)	Maximum (HU)	Mean (HU)	StandardDeviation (HU)
ROI	275,5260	100,00	-1000,00	10276,00	1992,02	2322,95
INCERTO	6,8307	2,48	388,67	6665,47	1306,57	1609,06
G1	92,1287	33,44	-833,36	333,13	-59,21	229,67
G2	55,6011	20,18	-1000,00	1499,61	957,75	343,82
G3	53,0271	19,25	1610,70	3166,02	2266,92	452,34
G4	50,4350	18,30	3221,56	6609,93	4703,49	946,88
G5	17,5030	6,35	6721,02	10276,00	7695,91	632,10

Figura 40: K = 5 Istogramma con le gaussiane sovrapposte, segmenti volumetrici e risultati delle analisi volumetriche

L'analisi con cinque componenti gaussiane mostra anch'essa una buona capacità di classificazione dei voxel, nonostante il lieve aumento della classe incerta (2,48%). Analogamente al modello con quattro gaussiane, la componente G1 risulta essere la più rappresentata ed è compatibile con il materiale polimerico PCL per le stesse ragioni già presentate.

Rispetto al caso precedente, si osserva invece una suddivisione della componente G2 nelle nuove classi G2 e G3, caratterizzate da medie rispettivamente pari a 957,75 HU e 2266,92 HU. La somma delle loro percentuali volumetriche risulta confrontabile con quella della G2 del modello a quattro gaussiane, suggerendo che il modello con cinque componenti sia in grado di distinguere ulteriormente tessuti precedentemente raggruppati. Tale separazione è inoltre chiaramente osservabile nel grafico del modello.

Le componenti G4 e G5 presentano i valori HU più elevati. In particolare, G4 mostra una marcata eterogeneità interna, evidenziata dall'elevata deviazione standard, sintomo di una iperclassificazione dei voxel al suo interno. È quindi possibile che una parte dei voxel appartenenti

alla porzione più densa di G4 debba essere associata alla componente G5 e che il modello con cinque gaussiane non riesca ancora a separare completamente tali tessuti.

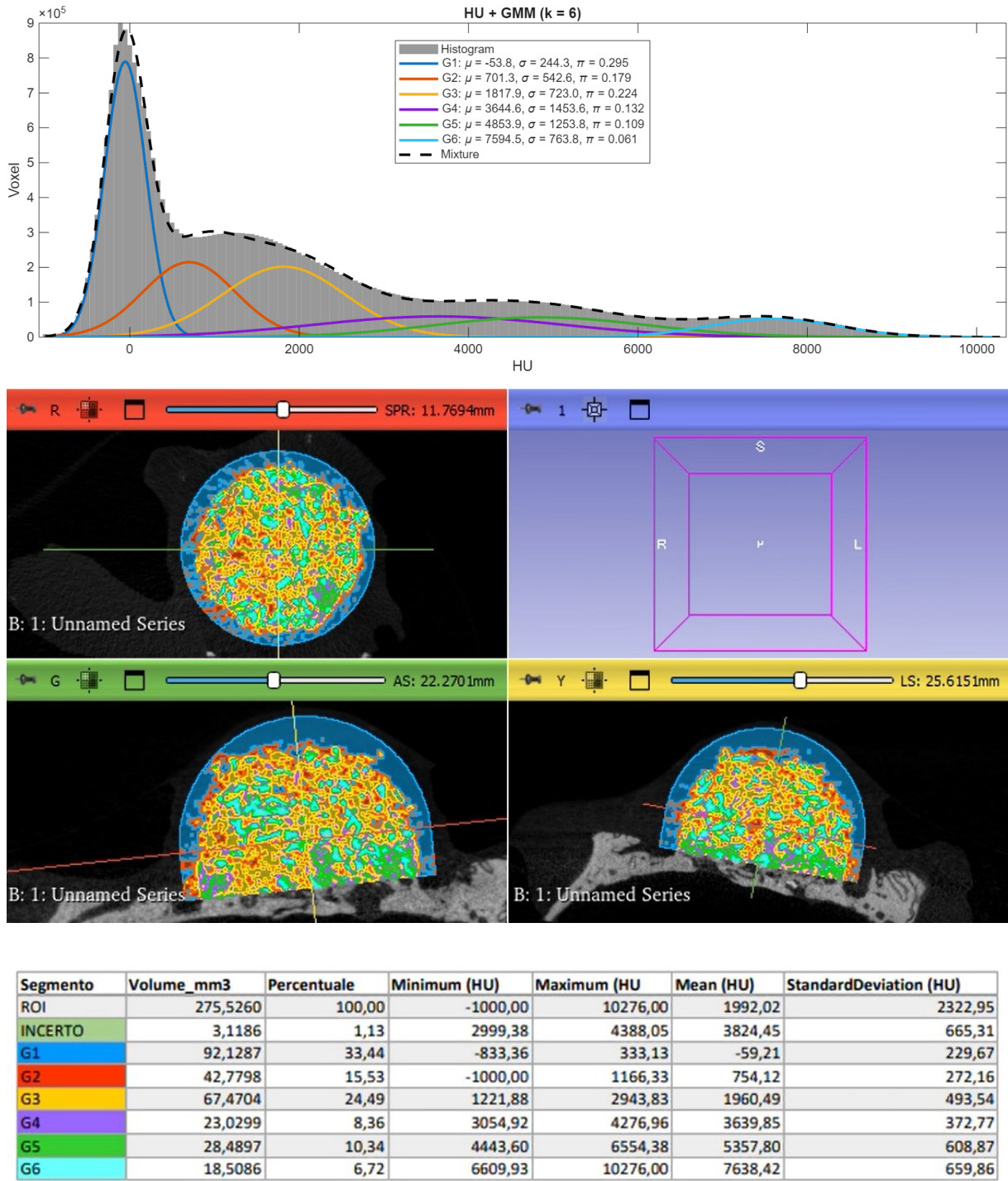
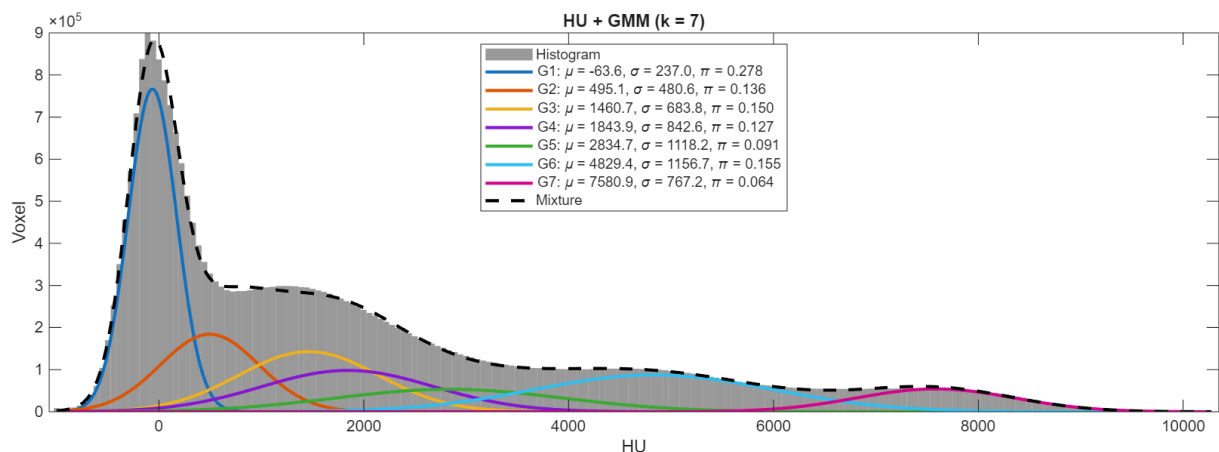


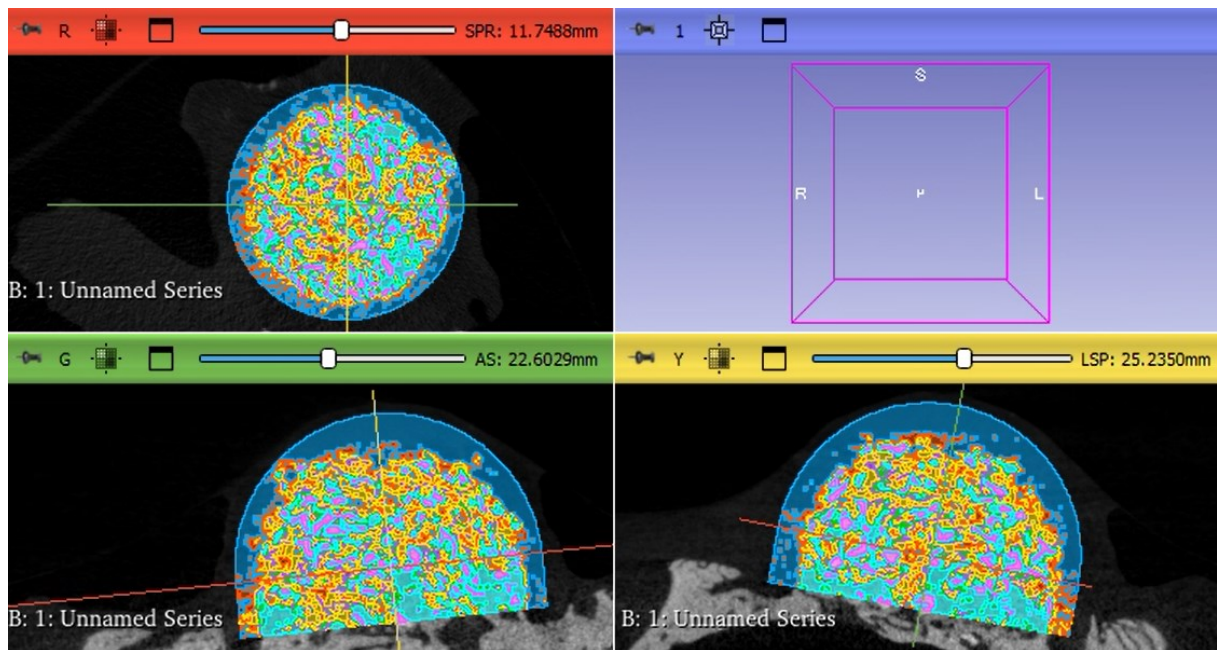
Figura 41: K = 6 Istogramma con le gaussiane sovrapposte, segmenti volumetrici e risultati delle analisi volumetriche

L'analisi con sei componenti mette in luce la conferma sia della capacità di classificazione dei voxel, essendo bassa la percentuale di volume incerto (1,13%), sia della componente polimerica

rappresentata da G1, che risulta sostanzialmente invariata rispetto al modello precedente. Anche G2 e G3 mostrano un comportamento analogo a quello osservato in precedenza, con un lieve incremento volumetrico di circa il 5% per entrambe le componenti.

Per quanto riguarda G4, si osservano significative diminuzioni del volume (-9,94%), della media HU (-1063,64 HU) e della deviazione standard (-574,11 HU), indice di una suddivisione della componente. Questa viene infatti ulteriormente separata nella nuova componente G5, caratterizzata da un volume pari al 10,34%, una media di 5357,80 HU e una deviazione standard di 608,87 HU. In tal modo risulta scomposta la componente che, nell'analisi precedente, mostrava una marcata eterogeneità interna. Ciò potrebbe suggerire una distinzione tra osso neoformato meno denso (G4) ed osso autologo più denso (G5). La componente G6, avente una percentuale volumetrica del 6,72%, una media di 7638,42 HU e una deviazione standard di 659,86 HU, potrebbe infine rappresentare la frazione eterologa maggiormente mineralizzata.



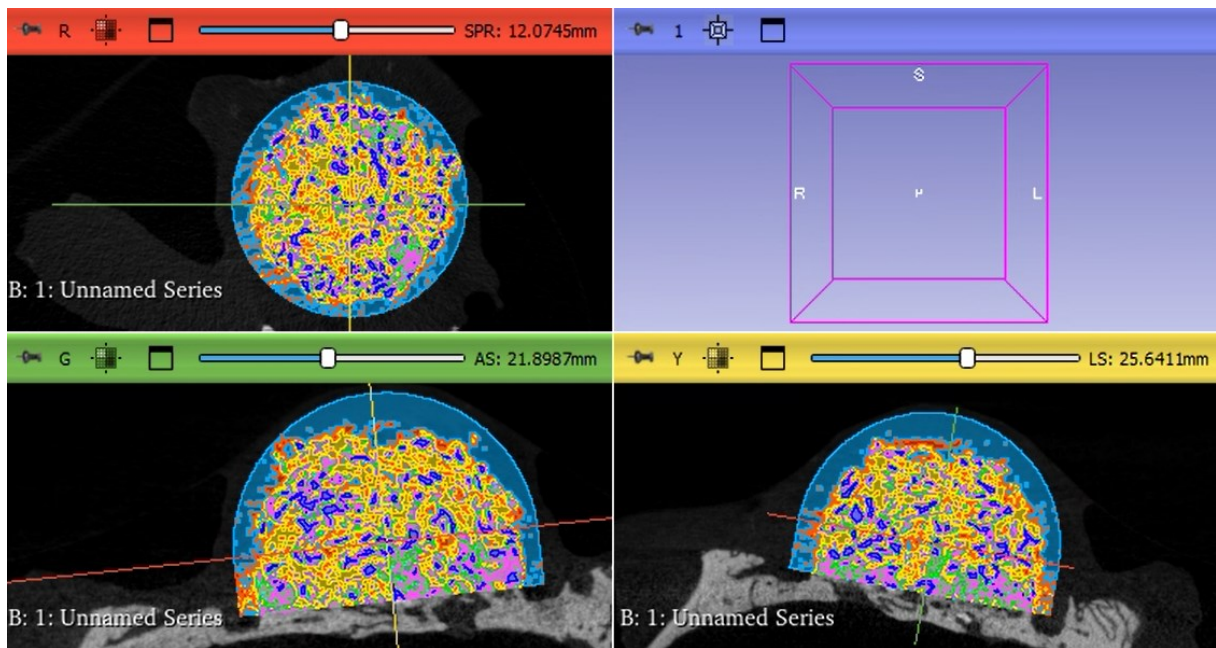
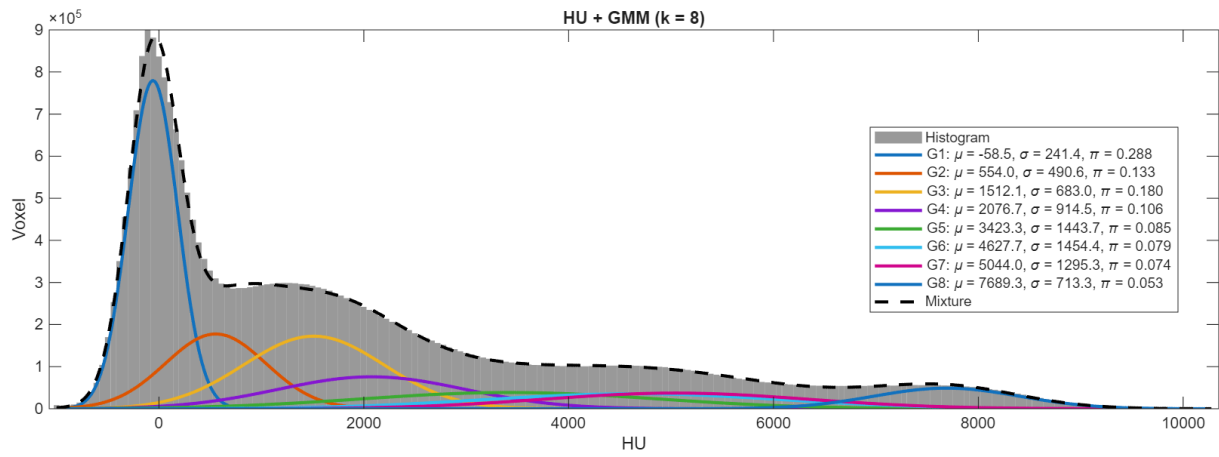


Segmento	Volume_mm3	Percentuale	Minimum (HU)	Maximum (HU)	Mean (HU)	StandardDeviation (HU)
ROI	275,5260	100,00	-1000,00	10276,00	1992,02	2322,95
INCERTO	6,7875	2,46	-833,36	3499,30	2394,47	644,49
G1	92,0353	33,40	-777,81	333,13	-58,43	228,46
G2	31,8080	11,54	-1000,00	944,14	640,54	219,08
G3	49,7514	18,06	999,69	1999,53	1482,46	299,89
G4	19,0712	6,92	2166,17	2721,64	2424,70	174,91
G5	13,9087	5,05	2832,74	3443,75	3120,85	192,01
G6	44,1580	16,03	3554,85	6609,93	4894,84	853,55
G7	18,0058	6,54	6665,47	10276,00	7667,14	645,92

Figura 42: K = 7 Istogramma con le variabili sovrapposte, segmenti volumetrici e risultati delle analisi volumetriche

Salendo con il numero di componenti si riscontra indicativamente una maggiore precisione nella definizione dei segmenti, osservabile dai valori di deviazione standard. Ciò che emerge in particolare è una possibile iper-classificazione tra G4 e G5, caratterizzate da un intervallo di valori HU molto ristretto, come evidenziato dalle deviazioni standard inferiori a 200 HU.

Si osserva inoltre un'elevata percentuale volumetrica della componente G6 (16,03%), associata ad una deviazione standard anch'essa elevata rispetto alle altre componenti. Infine, la componente G7 risulta molto simile alla G6 del modello precedente, indicando che, all'aumentare del numero di gaussiane, tale segmento rimane pressoché invariato.



Segmento	Volume_mm3	Percentuale	Minimum (HU)	Maximum (HU)	Mean (HU)	StandardDeviation (HU)
ROI	275,5260	100,00	-1000,00	10276,00	1992,02	2322,95
INCERTO	21,3277	7,74	2388,36	6665,47	4066,81	945,41
G1	92,1287	33,44	-833,36	333,13	-59,21	229,67
G2	31,8080	11,54	-1000,00	944,14	640,54	219,08
G3	61,8224	22,44	999,69	2332,81	1620,33	390,48
G4	15,5155	5,63	2499,45	3054,92	2758,62	175,20
G5	14,8774	5,40	3221,56	3999,22	3598,55	241,28
G6	0,9425	0,34	4332,50	4332,50	4332,50	NaN
G7	19,6005	7,11	4999,07	6609,93	5709,98	480,58
G8	17,5030	6,35	6721,02	10276,00	7695,91	632,10

Figura 43: K = 8 Istogramma con le variabili sovrapposte, segmenti volumetrici e risultati delle analisi volumetriche

Aumentando ulteriormente il numero di gaussiane, si osserva un'elevata percentuale di voxel incerti, pari al quarto segmento per ordine di percentuale volumetrica decrescente (7,74%). Si nota inoltre la quasi totale invariazione delle prime tre componenti gaussiane. Compare anche una componente (G6) caratterizzata da appena lo 0,34% del volume e da una deviazione standard nulla, segnale del fatto che i pochi voxel presenti possiedono il medesimo valore di HU. Si osserva infine il mantenimento pressoché invariato della componente gaussiana con i

valori HU più elevati, presumibilmente rappresentativa dell'osso eterologo. Tali elementi risultano indicativi di un'eccessiva suddivisione dei tessuti.

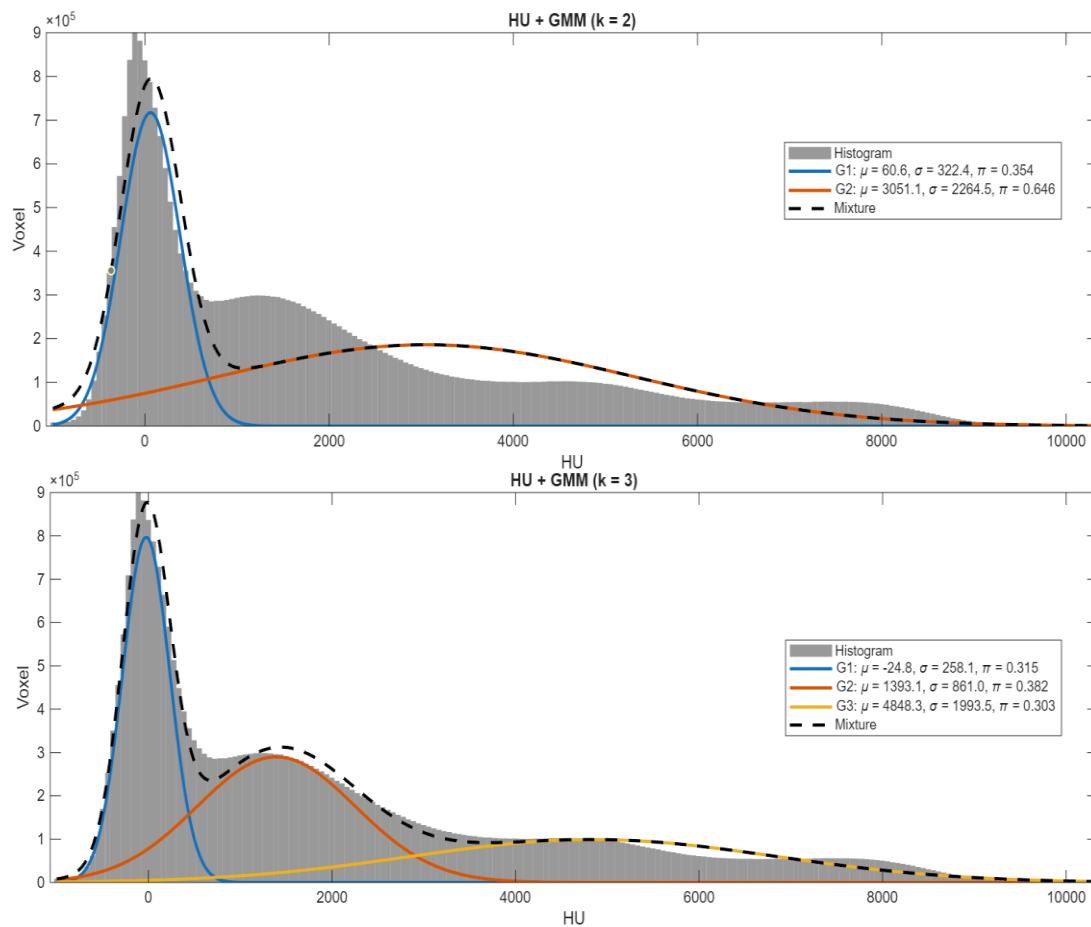
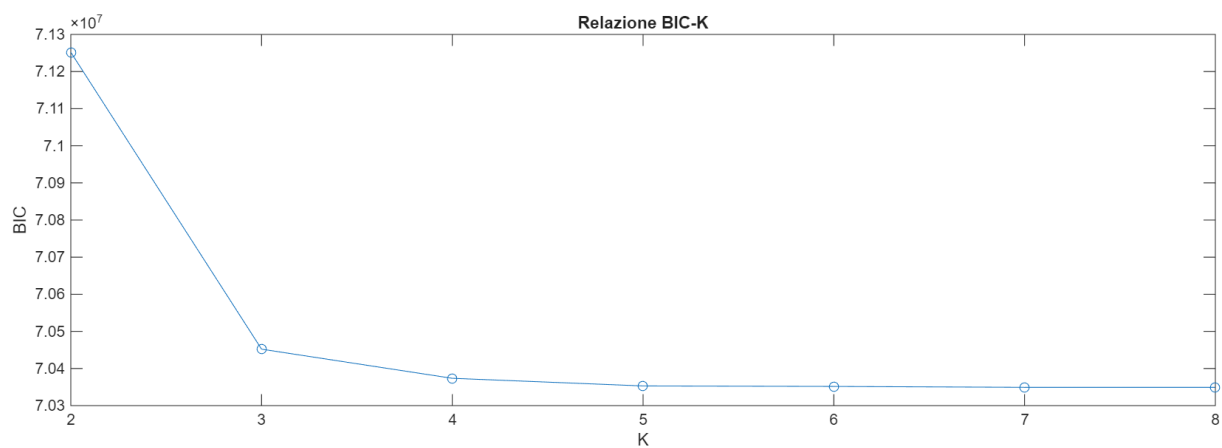
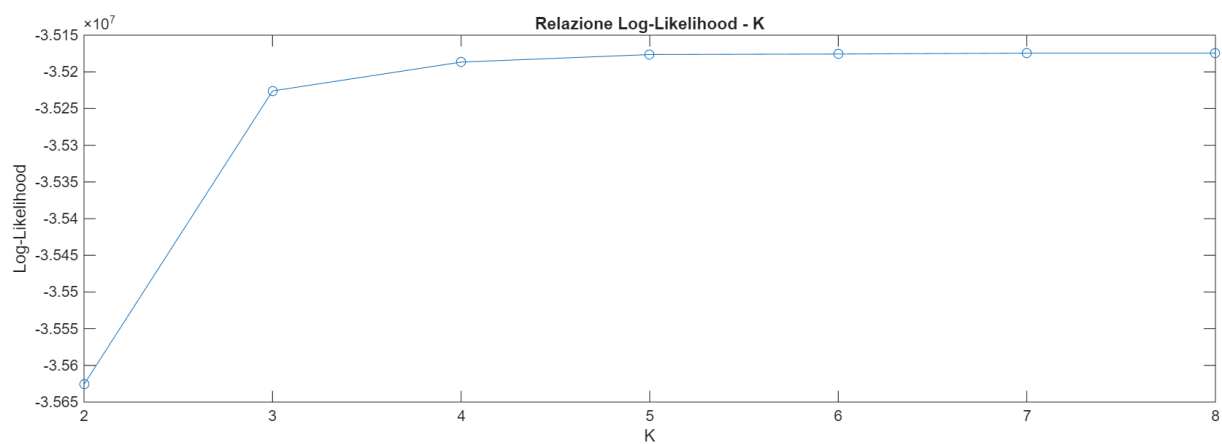


Figura 44: Istogrammi con le gaussiane sovrapposte per $K = 2$ e $K = 3$

Considerando invece i modelli con $K = 2$ e $K = 3$ (Fig.44), dall'osservazione dei relativi grafici emerge come essi risultino eccessivamente semplificati per rappresentare adeguatamente la distribuzione dei dati. In particolare, il fitting del modello appare insufficiente, evidenziando una scarsa capacità di descrivere la complessità della distribuzione dei valori HU presenti nel campione. Ciò è riscontrabile anche nei relativi grafici di BIC e verosomiglianza (Fig.45) in cui è osservabile una scarsa rappresentazione della distribuzione, evidenziata da alti valori di BIC e bassi valori di verosomiglianza.



Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
BIC	71252034,34	70452035,06	70373549,35	70352977,26	70351634,8	70349212,9	70349217,4



Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Verosomiglianza	-35625974,1	-35225948,7	-35186680,03	-35176368,17	-35175671,11	-35174434,37	-35174410,78

Figura 45: Rappresentazione grafica della relazione di K col BIC e Log-Likelihood coi rispettivi valori nelle tabelle

Alla luce di quanto osservato nelle analisi per ogni valore di K compreso tra 2 e 8 e considerando i relativi grafici dell'indice bayesiano BIC e della verosomiglianza logaritmica, emergono le seguenti considerazioni:

- Per $K = 2$ e $K = 3$ si riscontra una rappresentazione insufficiente della distribuzione dei dati, poiché i grafici mostrano variazioni ancora marcate degli indici, indicando una capacità descrittiva non adeguata del modello.
- Per $K = 4$ e $K = 5$ si osserva una buona rappresentazione della distribuzione, in quanto le variazioni degli indici risultano sensibilmente ridotte rispetto ai casi precedenti.
- $K = 6$ conferma una buona capacità di classificazione dei voxel e costituisce il primo livello oltre il quale gli indici del modello tendono a stabilizzarsi, senza mostrare variazioni significative.
- Per $K = 7$ e $K = 8$, pur non osservandosi miglioramenti apprezzabili negli indici, emerge una crescente tendenza all'iper-classificazione dei tessuti e un aumento dell'incertezza nella classificazione dei voxel, indicando una complessità del modello non giustificata dai dati.

Oltre al campione analizzato nel dettaglio, di seguito viene riportata una tabella riassuntiva relativa ai campioni inclusi nello studio. Per ciascuna μ CT sono sintetizzate le principali variazioni osservate al variare del numero di componenti gaussiane, menzionando il comportamento dei parametri delle componenti e le caratteristiche più significative emerse dall'analisi. L'esempio analizzato nel dettaglio in precedenza corrisponde al campione n.3 riportato in tabella.

Semplificazioni ed indicazioni della tabella successiva:

- *std: deviazione standard;*
- *range: differenza tra valore massimo e minimo;*
- *classificazione dei voxel: si fa riferimento alla classe dei voxel incerti, se efficace allora presenta una bassa percentuale volumetrica (si evidenzia che una percentuale alta di voxel incerti non è un requisito sufficiente per poter definire una erronea classificazione);*
- *classe eterogenea: alta std, range elevato e media centrata nel range;*
- *classe ben definita: bassa std e range ridotto;*
- *salvo diversa indicazione, i dati riportati fanno riferimento alle percentuali volumetriche.*

μCT	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
1	Classificazione efficace dei voxel (1.13%); G1 e G2 prevalenti e definiti (33.57% std=191.24 HU, 30.49% std=457.55 HU); G3 e G4 meno presenti e più eterogenei (18% std=672.13 HU, 16.81% std=1256.97 HU).	Classificazione efficace (0.31%); G1 ben definita come con K=4; G2 e G3 ben definite e mostrate (21.69%, 21.38%); G4 eccessivamente eterogenea; G5 ben rappresenta.	Classificazione efficace (1.09%); G1, G2 e G3 rimaste pressoché invariati; G4 ben descritta; G5 presenta un range ampio ma std discreta (744.51 HU); G6 rimasta invariata.	Classificazione meno precisa (2.89%); G1, G2 e G3 indicativamente rimaste coerenti con le precedenti; classi successive alla G3 meno definite e più imprecise, sintomo di iperclassificazione.	Classificazione abbastanza imprecisa (4.39%); classi eccessivamente definite con range troppo ridotti per descrivere delle componenti (range corti, percentuali volumetriche basse e std variabili tra molto basse ed alte).
2	Classificazione efficace (0%); prevalenza di G1 e G2 (36.40%, 36.54%); G3 e G4 mal descritte ed eterogenee.	Classificazione efficace (0.15%); G1, G2 e G3 presenti in maggiori quantità (34.03%, 28.40%, 20.50%) e std basse (massima std = 467.45 HU relativa a G3); G4 eterogenea (std=1029.82 HU); G5 poco presente (6.26%) e abbastanza eterogenea.	Classificazione abbastanza imprecisa (4.22%); G1, G2 e G3 rimasti pressoché invariati; G4 ben definita; G5 non precisa (std=972.20 HU), range ampio con media prossima al limite inferiore (min=3384 HU, media=4899 HU, max=10375 HU); G6 ben definito e rappresentato.	Classificazione abbastanza imprecisa (4.21%); G1, G2 e G3 descritte come per i K inferiori (std basse e alte percentuali volumetriche); classi successive presentano std crescenti e volumi bassi, sintomo di iperclassificazione.	Classificazione abbastanza imprecisa (3.81%); numerosità di classi elevata per definire delle componenti (range corti, percentuali volumetriche basse e std variabili tra molto basse ed alte).
3	Classificazione efficace (0.18%); prevalenza di G1 e G2 (34.73%, 35.72%); G3 particolarmente presente (23.20%) ma poco precisa (std=1131.16 HU); G4 poco presente (6.17%).	Buona classificazione (2.48%); G1 rimasta invariata; G2 diminuita di volume (20.18%) ma ancora ben definita (std=343.82 HU); G3 rimasta invariata; G4 presente in maggiore percentuale (18.30%) ma eterogenea (std=946.88 HU); G5 poco presente (6.35%) e abbastanza eterogenea (std=632.10 HU).	Classificazione efficace (1.13%); G1, G2 e G3 analoghi ai precedenti; G4 diminuita in tutti i valori, mostrando una possibile suddivisione rispetto a K=5; G5 più rappresentata (10.34%), mantenendo una simile eterogeneità; G6 poco presente (6.72%) e avente std pari a 659.86 HU.	Classificazione meno precisa (2.46%); volumi delle G1, G2 e G3 mantenuti simili ai precedenti; classi particolarmente precise con range ridotti fino a G5 (std dell'ordine di 150 HU); G6 molto rappresentata (16.03%) ma presenta alta std (853.55 HU); G7 mostra i valori di G6 considerando K=6.	Classificazione molto incerta (7.74%); iperclassificazione generale oltre a G1, G2 e G3; range ristretti, std e percentuali volumetriche basse.
4	Buona classificazione (2.16%); Prevalenza di G1 (53.11%, std=259.47HU); a cui seguono G2 e G3 (22.90%, 18.82%) presentanti std crescenti (453.33 HU, 907.84 HU); G4 quasi assente (3%).	Classificazione molto incerta (7.71%); In questo caso particolare si osserva una mancanza di una classe, ossia la G1, rappresentata invece da G2 che presenta i valori precedenti della classe assente. Le classi successive sono indicativamente uguali alle precedenti.	Classificazione molto incerta (6.10%); G1 molto presente (24.98%) con una precisione molto elevata (std=102.54 HU), sintomo di classificazione erronea; G2 e G3 ben rappresentate (32.60%, 15.44%); classi successive meno rappresentate e presentanti una eterogeneità maggiore.	Classificazione molto imprecisa (8.23%); la classificazione è rimasta molto simile a K=6, con solamente delle piccole variazioni delle percentuali volumetriche. Si osserva dunque una iperclassificazione.	Classificazione molto imprecisa (8.68%); come con K=7, la classificazione risulta particolarmente eccessiva, mettendo alla luce percentuali volumetriche molto basse (1.02%, 1.80%) e std minime (97.57 HU).

In aggiunta vengono di seguito mostrati i valori medi, deviazioni standard, pesi, BIC e verosomiglianze dei modelli utilizzati per ciascuno dei quattro campioni mostrati nella tabella precedente.

Campione 1: PCL4

Parametri	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Media1	286,826	-4,348	-18,179	-39,572	-38,749	-45,846	-57,418
Sigma1	484,528	214,813	207,203	192,251	192,998	189,509	179,784
Peso1	0,498	0,309	0,300	0,274	0,275	0,266	0,241
Media2	3459,843	1156,313	929,976	618,516	633,672	493,336	314,987
Sigma2	2221,138	761,267	623,011	491,752	496,835	433,732	367,663
Peso2	0,502	0,377	0,308	0,237	0,246	0,190	0,146
Media3	0,000	4594,424	2615,949	1777,760	1789,706	1382,842	974,519
Sigma3	0,000	2007,623	1155,194	744,558	699,699	632,097	545,201
Peso3	0,000	0,314	0,217	0,219	0,193	0,173	0,135
Media4	0,000	0,000	5890,288	4429,598	3488,999	2236,896	1645,110
Sigma4	0,000	0,000	1509,425	1425,844	1295,641	928,178	767,707
Peso4	0,000	0,000	0,175	0,218	0,113	0,128	0,163
Media5	0,000	0,000	0,000	7533,292	5133,525	4388,357	2757,549
Sigma5	0,000	0,000	0,000	749,064	1317,799	1439,702	1096,029
Peso5	0,000	0,000	0,000	0,051	0,127	0,108	0,088
Media6	0,000	0,000	0,000	0,000	7634,508	5041,215	4032,120
Sigma6	0,000	0,000	0,000	0,000	694,992	1292,507	1466,205
Peso6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,045	0,090	0,084
Media7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7641,982	5206,126
Sigma7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	690,124	1038,780
Peso7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,045	0,088
Media8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7554,708
Sigma8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	733,386
Peso8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Verosomiglianza	-35309164,53	-34877626,88	-34843738,8	-34812190,12	-34811426,51	-34808069,14	-34807054,05

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
BIC	70618415,1	69755391,42	69687666,9	69624621,16	69623145,57	69616482,45	69614503,89

Campione 2: PCL6

Parametri	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Media1	449,237	-26,079	-46,913	-70,136	-87,514	-87,305	-96,217
Sigma1	635,033	212,700	199,831	185,346	176,931	177,076	172,171
Peso1	0,699	0,342	0,327	0,301	0,280	0,281	0,267
Media2	3963,038	1090,958	848,943	591,984	381,891	385,447	290,909
Sigma2	2383,109	745,347	578,981	456,021	355,049	356,313	306,666
Peso2	0,301	0,457	0,366	0,289	0,201	0,205	0,151
Media3	0,000	5059,614	2388,068	1662,460	1124,820	1123,913	808,766
Sigma3	0,000	2115,412	1115,154	701,190	532,244	508,648	472,526
Peso3	0,000	0,201	0,192	0,221	0,196	0,170	0,135
Media4	0,000	0,000	6544,079	4221,605	1952,729	1770,471	1243,894
Sigma4	0,000	0,000	1309,994	1564,518	852,460	805,793	626,973
Peso4	0,000	0,000	0,115	0,130	0,159	0,151	0,125
Media5	0,000	0,000	0,000	7494,020	4721,600	3009,779	1771,932
Sigma5	0,000	0,000	0,000	721,625	1497,417	1118,742	815,153
Peso5	0,000	0,000	0,000	0,059	0,111	0,065	0,126
Media6	0,000	0,000	0,000	0,000	7574,408	5408,459	3181,776
Sigma6	0,000	0,000	0,000	0,000	670,555	1248,868	1217,259
Peso6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,078	0,082
Media7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7634,519	5635,715
Sigma7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	640,873	1149,921
Peso7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,049	0,064
Media8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7641,918
Sigma8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	639,924
Peso8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,049

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Verosomiglianza	-34695015,75	-34176678,25	-34105241,27	-34062064,87	-34053055,79	-34052294,55	-34050980,02

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
BIC	69390117,53	68353494,16	68210671,84	68124370,66	68106404,13	68104933,27	68102355,84

Campione 3: PCL8

Parametri	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Media1	60,583	-24,808	-30,374	-44,341	-53,773	-63,611	-58,490
Sigma1	322,352	258,091	255,413	250,121	244,334	236,959	241,362
Peso1	0,354	0,315	0,313	0,306	0,295	0,278	0,288
Media2	3051,054	1393,146	1302,134	894,158	701,260	495,070	553,995
Sigma2	2264,525	860,957	804,632	617,321	542,635	480,594	490,621
Peso2	0,646	0,382	0,362	0,226	0,179	0,136	0,133
Media3	0,000	4848,273	4063,880	2051,728	1817,892	1460,690	1512,120
Sigma3	0,000	1993,490	1564,231	779,571	722,962	683,768	682,996
Peso3	0,000	0,303	0,265	0,205	0,224	0,150	0,180
Media4	0,000	0,000	7578,410	4541,179	3644,597	1843,865	2076,714
Sigma4	0,000	0,000	774,408	1281,890	1453,639	842,645	914,475
Peso4	0,000	0,000	0,060	0,200	0,132	0,127	0,106
Media5	0,000	0,000	0,000	7587,123	4853,888	2834,665	3423,277
Sigma5	0,000	0,000	0,000	765,630	1253,776	1118,189	1443,736
Peso5	0,000	0,000	0,000	0,062	0,109	0,091	0,085
Media6	0,000	0,000	0,000	0,000	7594,476	4829,361	4627,713
Sigma6	0,000	0,000	0,000	0,000	763,761	1156,713	1454,409
Peso6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,155	0,079
Media7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7580,908	5043,970
Sigma7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	767,241	1295,254
Peso7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,074
Media8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7689,294
Sigma8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	713,345
Peso8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Verosomiglianza	-35625974,15	-35225948,7	-35186680,03	-35176368,17	-35175671,11	-35174434,37	-35174410,78

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
BIC	71252034,34	70452035,06	70373549,35	70352977,26	70351634,76	70349212,9	70349217,35

Campione 4: PCL11

Parametri	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Media1	155,069	84,335	67,499	-38,198	-16,115	-17,103	-12,383
Sigma1	346,416	293,364	279,721	152,642	194,381	195,659	204,533
Peso1	0,576	0,507	0,475	0,144	0,221	0,218	0,240
Media2	2441,020	1124,104	920,217	176,956	222,223	186,943	221,033
Sigma2	1733,939	740,629	686,245	367,971	387,553	357,454	375,795
Peso2	0,424	0,265	0,281	0,428	0,345	0,252	0,286
Media3	0,000	3434,752	3008,267	1319,669	1177,978	436,754	627,960
Sigma3	0,000	1708,089	1217,264	694,502	731,388	515,825	609,404
Peso3	0,000	0,228	0,213	0,237	0,176	0,160	0,103
Media4	0,000	0,000	6271,818	3381,312	1837,549	1491,133	1328,227
Sigma4	0,000	0,000	861,971	981,949	811,154	638,126	728,909
Peso4	0,000	0,000	0,031	0,156	0,108	0,166	0,099
Media5	0,000	0,000	0,000	6177,296	3663,604	3122,932	1693,063
Sigma5	0,000	0,000	0,000	892,432	795,648	1186,122	703,870
Peso5	0,000	0,000	0,000	0,035	0,113	0,098	0,095
Media6	0,000	0,000	0,000	0,000	6088,165	3532,122	3401,243
Sigma6	0,000	0,000	0,000	0,000	921,550	1058,715	960,792
Peso6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,080	0,090
Media7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	6414,109	3758,922
Sigma7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	776,186	1008,032
Peso7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,057
Media8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	6370,071
Sigma8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	790,577
Peso8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Verosomiglianza	-33627854,67	-33459608,17	-33436144,57	-33418201,44	-33419441,55	-33419752,11	-33420261,39

Indice	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
BIC	67255796,94	66919356,5	66872481,86	66836648,15	66839180,93	66839854,62	66840925,74

Per quanto concerne invece la progettazione delle gabbie per la rigenerazione ossea, i due metodi sviluppati consentono di ottenere gabbie efficaci, ben adattate all'anatomia ossea e facilmente personalizzabili nei principali parametri geometrici. Il primo metodo offre una maggiore precisione e un controllo più accurato della forma del dispositivo, ma richiede un numero maggiore di operazioni manuali. Il secondo metodo presenta invece un workflow più rapido e automatizzato, mantenendo una buona accuratezza geometrica, sebbene con minori possibilità di personalizzazione della regione di riempimento del difetto osseo.

I metodi sviluppati in questa sezione sono tutti modelli capaci di eseguire il loro compito di riempimento del difetto osseo in maniera efficace, consentendo allo stesso tempo di ottenere un ottimo adattamento alla superficie anatomica ossea e mantenendo la possibilità di modificare diversi parametri geometrici. In particolare, la lunghezza e la forma delle “ali laterali”, ossia le

porzioni a contatto con l'osso, possono essere facilmente adattate alle esigenze cliniche e anatomiche del caso specifico. Nel primo metodo tali modifiche possono essere effettuate intervenendo sulla regione selezionata di partenza e sulle spline utilizzate per la generazione della superficie, mentre nel secondo metodo dipendono principalmente dalla curva 3D impiegata per il taglio della mesh anatomica. Inoltre, risulta possibile personalizzare parametri quali spessore della struttura e dimensione dei fori attraverso il workflow sviluppato in *Grasshopper*.

Sono tuttavia riscontrabili alcune differenze tra i due metodi descritti per la realizzazione della mesh bidimensionale da cui vengono successivamente generate le gabbie tridimensionali.

- Il primo metodo è maggiormente preciso e offre un grado superiore di personalizzazione, in particolare nella zona corrispondente alla “pancia” del dispositivo medico. Infatti, la superficie generata mediante “*Loft Wizard*” può essere modificata direttamente dall'operatore mediante le spline, consentendo di controllarne in modo accurato forma e andamento (Fig.46). Tuttavia, tale approccio risulta più macchinoso poiché, per una buona riuscita della personalizzazione, è richiesta la modifica delle singole spline. Dunque, necessita di più operazioni di modifica.

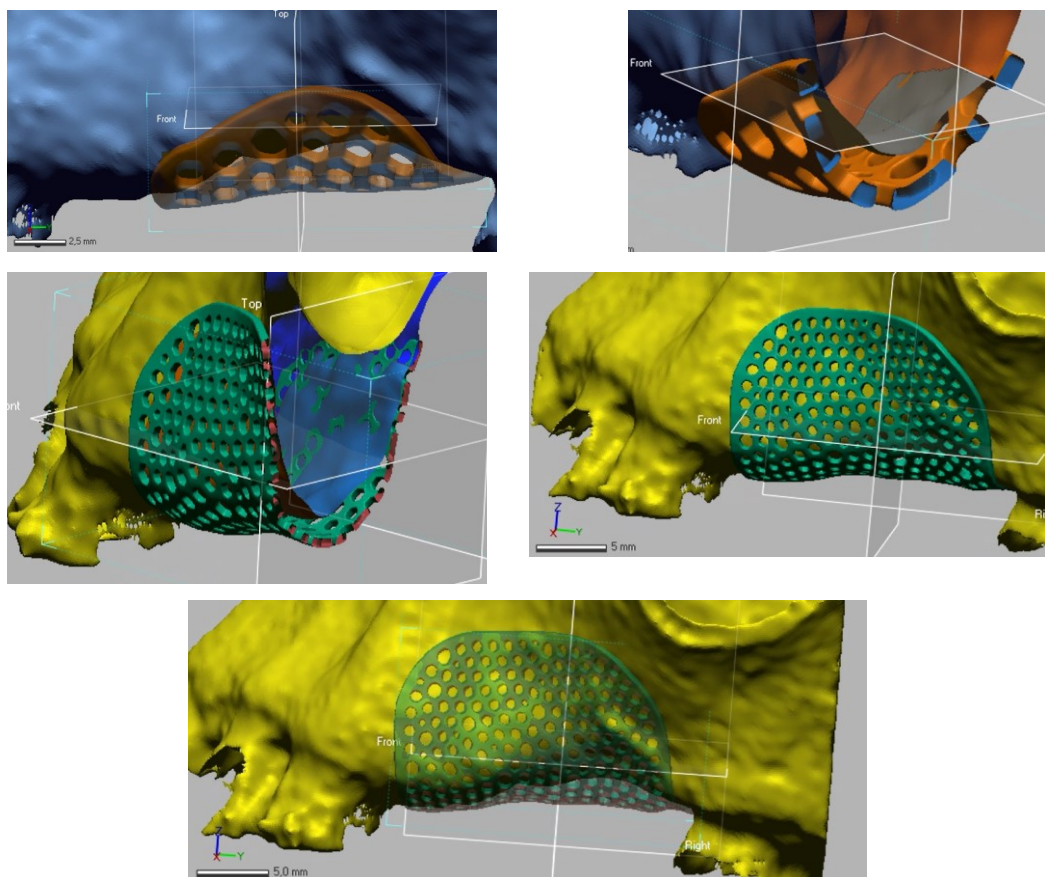


Figura 46: Rappresentazioni di due modelli esemplificativi, realizzati col primo metodo e di forma diversa. Si osserva come la forma della “pancia” non è rettilinea, ma modellata in relazione alla forma desiderata.

- Il secondo metodo presenta invece un workflow più rapido, automatico e immediato, permettendo di ottenere il modello finale con un numero ridotto di passaggi. Sebbene il risultato sia meno preciso rispetto al primo approccio, mantiene comunque un ottimo livello di accuratezza geometrica. Il principale limite di questo metodo riguarda la ridotta possibilità di personalizzazione della regione di riempimento del difetto, ossia la “pancia”, poiché la chiusura della porzione mancante della mesh viene generata automaticamente dal software e non può essere controllata direttamente dall'operatore (Fig.47).

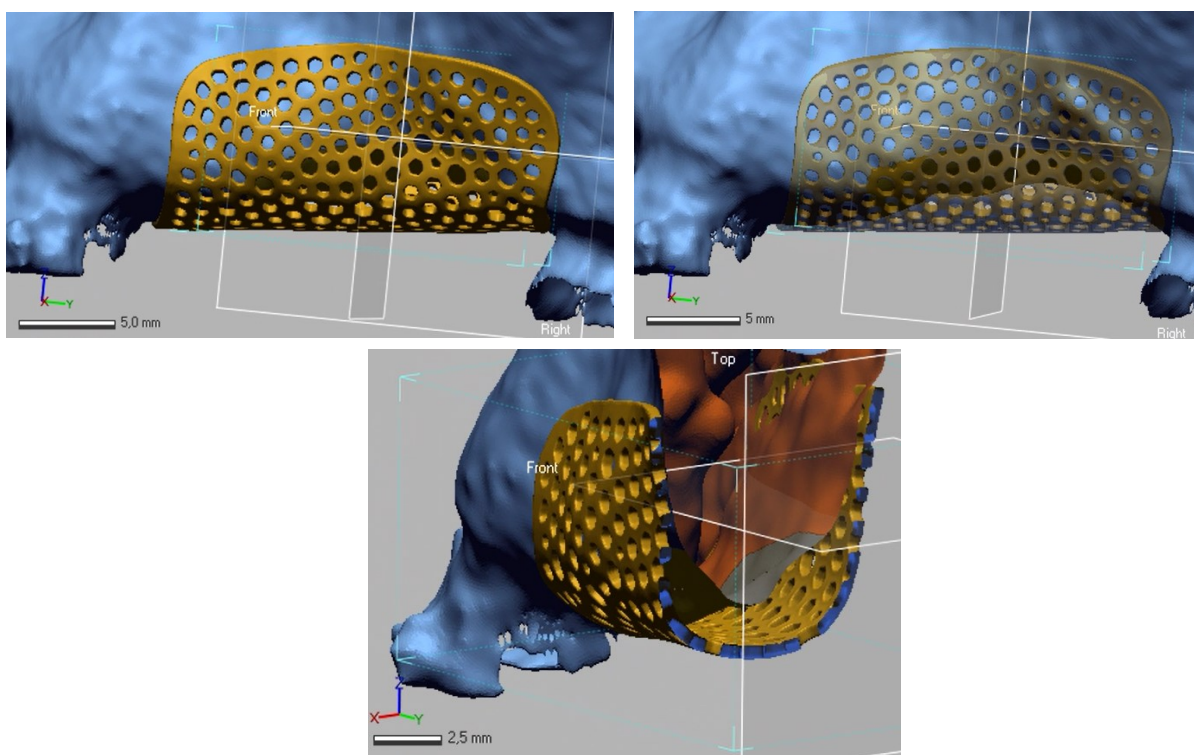


Figura 47: Modello esemplificativo del secondo metodo. Rispetto al primo metodo, si riscontra una forma della “pancia” tonda e rettilinea

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di sviluppare ed applicare una metodologia statistica per l'analisi tissutale all'interno di una cupola in PCL mediante classificazione dei voxel basata su modelli *Gaussian Mixture Model*, nonché di definire la progettazione di gabbie personalizzate per la rigenerazione ossea guidata.

L'analisi statistica dei dati delle μ CT ha evidenziato come il numero di componenti gaussiane e di parametri influenzi il modello utilizzato. In particolare, i modelli con $K = 2$ e $K = 3$ sono risultati insufficienti a rappresentare la complessità della distribuzione dei dati, mentre i modelli con $K = 4$ e $K = 5$ hanno mostrato una buona capacità di classificazione. Il modello con $K = 6$ è risultato mediamente il più equilibrato, consentendo una rappresentazione dettagliata dei diversi compartimenti senza introdurre fenomeni di iper-classificazione. Per valori superiori di K , infatti, non sono stati osservati miglioramenti significativi degli indici di valutazione, mentre è aumentata la frammentazione delle classi e l'incertezza associata alla classificazione dei voxel.

Sulla base di ciò è possibile formulare alcune ipotesi circa la natura dei materiali rappresentati da ciascuna componente considerando $K=6$:

- G1 presenta nella maggior parte delle analisi una media dei valori di HU molto bassa, una deviazione standard contenuta e costituisce la componente predominante. Inoltre, risulta localizzata prevalentemente lungo i bordi della cupola. Tali caratteristiche suggeriscono che questa componente rappresenti il materiale polimerico dello scaffold.
- G2 è caratterizzata da una bassa deviazione standard e da una media dei valori di HU ancora contenuta, risultando compatibile con la presenza di sangue o tessuti a bassa densità.
- G3 presenta valori medi di HU superiori rispetto a G2 ed è distribuita prevalentemente nella porzione centrale del volume interno della cupola. La sua distribuzione spaziale e le caratteristiche densitometriche suggeriscono un'attribuzione ai tessuti molli.
- G4 presenta valori di HU riconducibili a tessuto maggiormente radiodenso rispetto ai tessuti molli e, sulla base della distribuzione osservata, può essere associata a tessuto osseo neoformato.
- G5 è caratterizzata da valori di HU più elevati rispetto a G4 e può essere interpretata come tessuto osseo autologo maggiormente mineralizzato, comprendendo sia l'osso autologo impiantato inizialmente sia il tessuto osseo neoformato che ha raggiunto un grado più avanzato di maturazione. A conferma di ciò, una buona parte di tale

componente viene mostrata nei segmenti volumetrici alla base degli scaffold, luogo dove è stata dichiarata la maggiore presenza di osso autologo impiantato al momento dell'innesto.

- G6 presenta i valori di HU più elevati tra tutte le componenti e può essere ragionevolmente attribuita al materiale osseo eterologo bovino, caratterizzato da una maggiore densità radiologica.

Tra i casi analizzati, merita particolare attenzione il campione n.4, che ha evidenziato una classificazione caratterizzata da un'elevata incertezza e da un comportamento non uniforme al variare del numero di componenti gaussiane. Tale risultato rappresenta un esempio di applicazione del modello per il quale risulta necessario procedere con analisi aggiuntive, al fine di verificare la classificazione ottenuta. Come emerso dall'analisi, infatti, l'assegnazione delle classi non appare coerente con gli altri campioni, suggerendo una possibile classificazione non corretta. Le cause di tale comportamento possono essere molteplici e comprendere, ad esempio, particolarità intrinseche dell'acquisizione, caratteristiche specifiche del campione oppure limitazioni o instabilità del modello di classificazione adottato.

Inoltre, sulla base delle indicazioni iniziali dello studio, il volume di osso autologo innestato era pari a circa $0,18 \text{ mm}^3$ e risultava indicativamente confrontabile con quello del materiale osseo eterologo. Al termine delle otto settimane di impianto, tuttavia, le analisi hanno evidenziato una diversa distribuzione volumetrica delle componenti. Tale osservazione porta quindi a chiedersi come questi volumi siano cambiati nel tempo. Se l'aumento della componente riconducibile all'osso autologo può essere spiegato dalla neoformazione ossea avvenuta durante il periodo di guarigione⁵⁶, rimane invece aperta la questione relativa al comportamento del materiale osseo eterologo. In letteratura è riportato che il materiale osseo eterologo va incontro a un progressivo rimodellamento, favorendo la formazione di nuovo tessuto osseo^{57 58}. Tuttavia, il suo riassorbimento è generalmente molto lento^{57 58}. Dunque, è possibile ipotizzare che nei nostri studi il tessuto osseo si sia sviluppato attorno al materiale eterologo, rendendone più complessa la distinzione nell'ambito delle analisi effettuate.

Su quanto ottenuto, evidenziato e ipotizzato, è importante definire che i risultati rappresentano dati statistici preliminari, utili per una prima visualizzazione quantitativa dei tessuti presenti all'interno dei campioni. Una validazione più approfondita richiederà infatti il confronto con metodiche di riferimento più accurate e concrete, quali le analisi istologiche, che permettono una caratterizzazione diretta e dettagliata dei diversi tipi di tessuto. Tale necessità è confermata anche dalla letteratura, nella quale è stato evidenziato che, in campioni trattati con materiale

osseo eterologo bovino, alcune aree interpretate radiograficamente come tessuto osseo corrispondevano in realtà a particelle residue del biomateriale all'analisi istologica⁵⁹. Pertanto, anche le interpretazioni formulate nel presente studio devono essere considerate come ipotesi, da confermare mediante successive analisi istologiche.

Parallelamente, è stato sviluppato un workflow per la progettazione di gabbie personalizzate per la rigenerazione ossea guidata. La metodologia proposta ha mostrato un ottimo adattamento anatomico e un'ampia possibilità di personalizzazione dei parametri geometrici del dispositivo. Al suo interno è stata inoltre introdotta la possibilità di adottare due differenti approcci per la generazione della mesh di base della gabbia, consentendo di variare il protocollo in funzione delle esigenze specifiche. I due metodi sono entrambi valevoli e portano entrambi alla medesima soluzione, conferendo proprietà differenti al dispositivo in base alle esigenze cliniche.

6. APPENDICI

All'interno delle presenti appendici sono riportati tutti i codici implementati sui software *3D Slicer* e *Matlab*, utilizzati per le analisi e le procedure descritte nel testo. Ogni codice è accompagnato dai relativi dettagli, funzioni e finalità.

Nei codici riportati potrebbe essere necessario apportare alcune semplici modifiche prima dell'esecuzione, come ad esempio l'aggiornamento dei nomi dei file, dei percorsi di salvataggio o di altri parametri specifici del caso in esame. Per questo motivo, si consiglia di copiare preventivamente ciascun codice in un file di testo o in un documento *Word*, effettuare le modifiche necessarie e successivamente incollarlo nel software di destinazione per l'esecuzione. Tutti i punti del codice che richiedono un intervento da parte dell'utente saranno esplicitamente indicati.

Porre particolare attenzione alle virgolette utilizzate nei codici: le doppie virgolette devono rimanere verticali (" ") e non essere convertite in virgolette tipografiche (“ ”), poiché ciò potrebbe causare errori durante l'esecuzione dei programmi. In particolare, se i codici venissero modificati su *Microsoft Word*, è possibile che le virgolette verticali vengano modificate in automatico con quelle tipografiche. In tal caso, si possono ripristinare quelle corrette digitandole e premendo immediatamente il comando di annullamento (Ctrl + Z). Prima di eseguire i codici, si consiglia pertanto di verificare che le virgolette siano state mantenute nel formato corretto.

6.A. Appendice A – Codici per 3D Slicer

6.A.1. Codice per estrazione del volume ROI

Il presente codice è adoperato per ottenere un dataset costituito esclusivamente dai voxel relativi alla regione di interesse nella cupola. Per il corretto funzionamento, è necessario avere importato sul software *3D Slicer* i seguenti file:

- μ CT da analizzare (nel codice è rappresentata da “1: Unnamed Series”);
- file stl contenente la mesh ROI (nel codice di seguito prende il nome di “ROI_PCL6_PROVA7”).

Per il corretto funzionamento del programma, è necessario modificare nel codice i nomi dei file affinché corrispondano a quelli effettivamente utilizzati.

Una volta completate le modifiche, copiare il codice e incollarlo nella console *Python* di *3D Slicer*.

```
# Richiamo del volume della  $\mu$ CT
volumeNode = slicer.util.getNode("1: Unnamed Series") # Modificare in base al nome del volume

# Creazione della segmentazione e le associa il volume
segmentationNode = slicer.vtkMRMLSegmentationNode()
slicer.mrmlScene.AddNode(segmentationNode)
segmentationNode.CreateDefaultDisplayNodes()
segmentationNode.SetReferenceImageGeometryParameterFromVolumeNode(volumeNode)

# Creazione del segment chiamato "ROI" dal modello STL
"ROI_PCL6_PROVA7" importato
modelNode = slicer.util.getNode("ROI_PCL6_PROVA7") # Modificare in base al nome del file stl

segmentId =
segmentationNode.AddSegmentFromClosedSurfaceRepresentation(
    modelNode.GetPolyData(),
    "ROI",
    [1.0,0.0,0.0]
)

# Valori dei voxel del volume solo nella regione segmentata
import numpy as np
volumeArray = slicer.util.arrayFromVolume(volumeNode)
segmentArray =
slicer.util.arrayFromSegmentBinaryLabelmap(segmentationNode,
segmentId, volumeNode)
segmentVoxels = volumeArray[segmentArray != 0] # Maschera binaria
```

Il codice richiama il volume importato su *3D Slicer* inserendolo all'interno di una variabile chiamata "**volumeNode**", la quale è stata associata in successione ad una segmentazione volumetrica neocostituita.

A questo punto, la ROI allineata è stata convertita in un segmento chiuso, tale da definire la regione volumetrica per l'analisi.

Infine, sono stati estratti i valori di HU interni tramite una maschera binaria: ai voxel esterni al segmento è stato associato il valore binario "0", a quelli interni il valore "1" e sono stati

selezionati solamente i voxel della μ CT aventi quest'ultimo valore. Il risultato ottenuto è un dataset costituito esclusivamente dai voxel relativi alla regione di interesse nella cupola.

6.A.2.Codice per l'acquisizione dei valori di HU

Lo script qui presentato viene utilizzato di seguito al precedente e permette l'acquisizione del numero di voxel per ciascun valore di HU all'interno dell'area designata. Per il suo funzionamento, non è necessario avere file aggiuntivi oltre a quelli già elencati nel codice 6.A.1. e necessita di conseguenza dell'esecuzione del precedente. Inoltre, si specifica che non ha bisogno di modifiche.

```
# Estrazione dei valori di HU e conteggio per ogni valore tramite  
return_counts  
hu, voxel = np.unique(segmentVoxels.astype(np.int32),  
return_counts=True)  
  
# Creazione di una tabella  
import vtk  
tableNode = slicer.mrmlScene.AddNewNodeByClass("vtkMRMLTableNode")  
table = tableNode.GetTable()  
  
# Aggiunta colonna per il numero dei voxel  
col1 = vtk.vtkIntArray()  
col1.SetName("VOXELS")  
table.AddColumn(col1)  
  
# Aggiunta Colonna per I valori di HU  
col2 = vtk.vtkIntArray()  
col2.SetName("HU")  
table.AddColumn(col2)  
  
# Creazione del numero di righe  
table.SetNumberOfRows(len(hu))  
  
# Inserimento dei dati in tabella  
for i in range(len(hu)):  
    table.SetValue(i, 0, (int(voxel[i])))  
    table.SetValue(i, 1, (int(hu[i])))
```

L'algoritmo sopra riportato è costituito da una prima componente adibita all'estrazione dei dati e una seconda per la formazione di una tabella destinata a contenere due colonne. Queste ultime

vengono compilate con la lista dei valori di HU e il rispettivo numero di voxel per ciascuno di essi. Con l'ausilio di questa metodologia, è stata ricavata una distribuzione quantitativa delle misure di attenuazione radiologica.

6.A.3. Codice per la creazione dei segmenti volumetrici per ogni gaussiana

Il presente codice deve essere eseguito in successione al codice presentato all'appendice 6.B.2, poiché rappresenta l'ultimo passaggio necessario per ottenere la rappresentazione grafica delle componenti gaussiane all'interno delle immagini μ CT mediante diverse colorazioni. Esso è stato inserito in questa sezione in quanto è da utilizzare su *3D Slicer*.

Questo script richiede particolare attenzione durante l'utilizzo, poiché necessita di diversi file in input:

- Gli output del codice 6.A.1, in particolare la segmentazione ("Segmentation") e il segmento ("ROI"); basterà dunque aver già lanciato in precedenza lo script menzionato;
- Il volume di riferimento importato ("1: Unnamed Series");
- Il file csv contenente la classificazione dei valori di HU ottenuto tramite lo script 6.B.2 ("classi_HU.csv").

Inoltre, è necessario modificare correttamente il percorso di localizzazione del file csv, in modo che il software possa recuperarlo ed utilizzarlo durante l'esecuzione dello script.

```
# INPUT
volumeNode = slicer.util.getNode("1: Unnamed Series") # Modificare
in base al nome del volume

segmentationNode = slicer.util.getNode("Segmentation")
roiSegmentName = "ROI"

csvPath =
r"\\fileshare\UserProfile$\carmlor62849\Desktop\PCL_CUPOLE_analisi\P
CL6_2\Segment_tessuti\5\classi_HU.csv" # Modificare il percorso di
dove si trova il file

import numpy as np
import vtk
from vtk.util import numpy_support
import slicer
```

```

# Carica il file relativo alle classi
data = np.loadtxt(csvPath, delimiter=",", skiprows=1)
hu_vals = data[:,0].astype(int)
class_vals = data[:,1].astype(int)
hu_to_class = dict(zip(hu_vals, class_vals)) # Associa ogni valore
HU a una classe GMM Letta dal file

# Recupera segmentazione e ROI
segmentation = segmentationNode.GetSegmentation()
roiSegmentID =
segmentation.GetSegmentIdBySegmentName(roiSegmentName)

if roiSegmentID is None:
    raise ValueError(f"Segmento ROI '{roiSegmentName}' non
trovato.")

# Creazione degli array, ovvero matrici contenenti i voxel del
volume (volumeArray) e la matrice binaria che identifica la ROI
(roiArray)
volumeArray = slicer.util.arrayFromVolume(volumeNode)
roiArray =
slicer.util.arrayFromSegmentBinaryLabelmap(segmentationNode,
roiSegmentID, volumeNode)

# Ritaglio del volume attorno alla ROI
roi_idx = np.argwhere(roiArray != 0)
if roi_idx.size == 0:
    raise ValueError("La ROI è vuota.")

zmin, ymin, xmin = roi_idx.min(axis=0)
zmax, ymax, xmax = roi_idx.max(axis=0) + 1
volCrop = volumeArray[zmin:zmax, ymin:ymax, xmin:xmax]
roiCrop = roiArray[zmin:zmax, ymin:ymax, xmin:xmax]
print("Crop shape:", volCrop.shape)
inside = (roiCrop != 0)

# Crea classMap SOLO SUL CROP
classMapCrop = np.zeros(volCrop.shape, dtype=np.uint8)
indices = np.where(inside)
for i in range(len(indices[0])):
    z = indices[0][i]
    y = indices[1][i]
    x = indices[2][i]
    hu = int(volCrop[z, y, x])
    if hu in hu_to_class:
        classMapCrop[z, y, x] = hu_to_class[hu]
    else:
        classMapCrop[z, y, x] = 0 # incerto
print("Classificazione voxel completata.")

```

Ricrea la matrice della ROI cambiando i valori di HU con le rispettive classi associate a hu_to_class; non ho più una matrice di HU ma bensì di classi

Definizione classi tramite una maschera binaria. ES: se un voxel ha classe 3, a quel voxel è associato True, altrimenti False

```
classDefs = [  
    ("INCERTO", inside & (classMapCrop == 0)),  
    ("G1", inside & (classMapCrop == 1)),  
    ("G2", inside & (classMapCrop == 2)),  
    ("G3", inside & (classMapCrop == 3)),  
    ("G4", inside & (classMapCrop == 4)),  
    ("G5", inside & (classMapCrop == 5)),  
    ("G6", inside & (classMapCrop == 6)),  
    ("G7", inside & (classMapCrop == 7)),  
    ("G8", inside & (classMapCrop == 8)),  
]  
print("Voxel per classe:")  
for name, mask in classDefs:  
    print(f"{name}: {int(np.sum(mask))}")
```

Conversione da coordinate spaziali IJK (colonne, righe, slice) a coordinate RAS (right, anterior, superior) del volume originale

```
ijkToRas = vtk.vtkMatrix4x4()  
volumeNode.GetIJKToRASMatrix(ijkToRas)
```

Definizione Funzione: Permette di creare una metodica di orientazione dei voxel nel volume per creare segmenti nuovi

```
def createOrientedImageFromMask(maskCrop, zmin, ymin, xmin,  
ijkToRasMatrix):  
    maskUInt8 = maskCrop.astype(np.uint8)  
    zdim, ydim, xdim = maskUInt8.shape  
    imageData = vtk.vtkImageData()  
    imageData.SetDimensions(xdim, ydim, zdim)  
    imageData.AllocateScalars(vtk.VTK_UNSIGNED_CHAR, 1)  
    flat = np.ascontiguousarray(maskUInt8).ravel(order="C")  
    vtkArray = numpy_support.numpy_to_vtk(  
        num_array=flat,  
        deep=True,  
        array_type=vtk.VTK_UNSIGNED_CHAR  
    )  
    imageData.GetPointData().SetScalars(vtkArray)  
    orientedImage = slicer.vtkOrientedImageData()  
    orientedImage.DeepCopy(imageData)  
    cropIJKToRAS = vtk.vtkMatrix4x4()  
    cropIJKToRAS.DeepCopy(ijkToRasMatrix)  
    originIJK = [xmin, ymin, zmin, 1.0]  
    originRAS = [0.0, 0.0, 0.0, 0.0]  
    ijkToRasMatrix.MultiplyPoint(originIJK, originRAS)  
    cropIJKToRAS.SetElement(0, 3, originRAS[0])
```

```

        cropIJKToRAS.SetElement(1, 3, originRAS[1])
        cropIJKToRAS.SetElement(2, 3, originRAS[2])
        orientedImage.SetGeometryFromImageToWorldMatrix(cropIJKToRAS)
        return orientedImage

# Ciclo di creazione di un segmento per ogni classe
import gc
segmentIdsCreated = []
# Evita rappresentazioni 3D pesanti in memoria
closedSurfaceName =
slicer.vtkSegmentationConverter.GetSegmentationClosedSurfaceRepresentationName()

segmentation.RemoveRepresentation(closedSurfaceName)
repName =
slicer.vtkSegmentationConverter.GetSegmentationBinaryLabelmapRepresentationName()

for className, classMask in classDefs:
    nvox = int(np.sum(classMask))
    if nvox == 0:
        print(f"{className}: vuota, salto.")
        continue
    print(f"Creo {className} con {nvox} voxel...")
    orientedImage = createOrientedImageFromMask(
        classMask,
        zmin,
        ymin,
        xmin,
        ijkToRas
    )
    segment = slicer.vtkSegment()
    segment.SetName(className)
    segment.AddRepresentation(repName, orientedImage)
    segmentID = segmentation.AddSegment(segment)
    segmentIdsCreated.append(segmentID)
    print(f"{className} aggiunto.")
    # Libera memoria
    del orientedImage
    del segment
    gc.collect()
    slicer.app.processEvents()

# Aggiornamento
segmentationNode.Modified()
slicer.app.processEvents()

```

Il codice utilizzato mostrato ha come primo step il recupero del volume microtomografico, della segmentazione contenente la ROI e del file recante le associazioni dei valori HU con le rispettive componenti di appartenenza.

Lo script procede poi con l'identificazione del volume minimo che contiene la ROI e lavora solo su quella porzione in quanto l'intera μ CT risulta molto pesante. Tramite quest'ultimo passo si riduce notevolmente il carico di memoria e rende possibile l'intero processo.

All'interno del volume ritagliato, a ciascun voxel viene assegnata la corrispondente classe ottenuta dall'analisi GMM. Le diverse classi vengono successivamente convertite in maschere binarie, ognuna contenente esclusivamente i voxel appartenenti a una specifica componente.

In successione viene definita una funzione che converte ciascuna maschera binaria in un'immagine orientata compatibile con 3D Slicer. Tale operazione è necessaria poiché una maschera binaria identifica solamente i voxel appartenenti a una determinata classe, senza possedere coordinate spaziali. L'immagine orientata, invece, essendo un contenitore di dati relativi ai valori di HU e alla posizione, include anche le informazioni spaziali per garantire un corretto posizionamento nel volume microtomografico.

Dunque, per ogni classe individuata, viene applicata la funzione con lo scopo di descrivere ogni componente gaussiana mediante una maschera binaria e delle coordinate spaziali nel sistema di riferimento RAS.

6.B. Appendice B – Codici per Matlab

6.B.1. Codice per lo sviluppo della GMM

Il codice presentato in questa sezione consente di sviluppare la GMM sul software *Matlab*, a seguito dell'estrazione dei valori di HU in *3D Slicer* mediante l'algoritmo 6.A.2 e della successiva conversione della tabella tsv in formato mat, descritta nella Sezione 7.5.

Per garantire il funzionamento del codice è necessario avere lo script su *Matlab* salvato nella stessa cartella in cui si trova il file della tabella in formato mat. Inoltre, è essenziale che il nome del file sia analogo al nome riportato nel codice.

```
load("Tab_Hist_PCL6_2.mat"); %Modificare in base al nome della tabella  
% Estrazione dei parametri dalla tabella
```

```

w = double(Tab_Hist_PCL6_2{:, "VOXELS"});
hu = double(Tab_Hist_PCL6_2{:, "HU"});

% Istogramma della distribuzione
figure(1)
bar(hu, w, 1)
xlabel('HU')
ylabel('Voxel')
title('HU - ROI')
step = min(diff(hu)); % minima variazione tra due HU successivi
nbins = length(hu); % numero bins
legend(sprintf('step = %.2f HU, bins = %d', step, nbins));

% Campionamento
Nsample = 4e6;
p = w/sum(w);
idx = randsample(length(hu), Nsample, true, p);
X = hu(idx);

K = 2:8;

% Inizializzazione delle variabili
BIC = zeros(size(K));
AIC = zeros(size(K));
mu = cell(size(K));
sigma = cell(size(K));
pi_comp = cell(size(K));

% Gaussian Mixture Model per ogni K
for i = 1:length(K)

    k = K(i);

    opts = statset('MaxIter', 1000, 'Display', 'off');

    % sviluppo effettivo
    GM = fitgmdist(X, k, ...
        'RegularizationValue', 1e-6, ...
        'Replicates', 5, ...
        'Options', opts );

    BIC(i) = GM.BIC;
    AIC(i) = GM.AIC;

    mu_tmp = GM.mu;
    sigma_tmp = sqrt(squeeze(GM.Sigma));
    pi_tmp = GM.ComponentProportion;

    % ordina le componenti per media crescente (usato per costruire la
    legenda)
    [mu_sorted, idx] = sort(mu_tmp);
    sigma_sorted = sigma_tmp(idx);
    pi_sorted = pi_tmp(idx);

```

```

mu{i} = mu_sorted;
sigma{i} = sigma_sorted;
pi_comp{i} = pi_sorted;

% Figura con istogramma + gaussiane della GMM
figure(i+1)
bar(hu, w, 1, 'FaceColor', [0.6 0.6 0.6], 'EdgeColor', 'none')
hold on

xgrid = linspace(min(hu), max(hu), 1000);
colors = lines(k);

N = sum(w);
binwidth = min(diff(hu));

ymix = zeros(size(xgrid));

legendEntries = cell(1, k+1);
legendEntries{1} = 'Histogram';

% plot gaussiane
for j = 1:k
    yj = pi_comp{i}(j) * normpdf(xgrid, mu{i}(j), sigma{i}(j)) * N *
binwidth;
    ymix = ymix + yj;

    plot(xgrid, yj, 'LineWidth', 2, 'Color', colors(j,:))

    legendEntries{j+1} = sprintf(['G%d: \mu = %.1f, \sigma = %.1f, '
...
    '\pi = %.3f'], j, mu{i}(j), sigma{i}(j), pi_comp{i}(j));
end

plot(xgrid, ymix, 'k--', 'LineWidth', 2)

xlabel('HU')
ylabel('Voxel')
title(sprintf('HU + GMM (k = %d)', k))
legend([legendEntries, {'Mixture'}], 'Location', 'best')
hold off

fprintf('k = %d | BIC = %.2f | AIC = %.2f\n', k, BIC(i), AIC(i));

fprintf('  Means: ');
disp(mu{i})

fprintf('  Std: ');
disp(sigma{i})

fprintf('  Weights: ');
disp(pi_comp{i})

fprintf('  Sum of weights: %.4f\n\n', sum(pi_comp{i}));
end

```

```

% Figura del BIC
figure(9)
plot(K, BIC, '-o')
xlabel('K')
ylabel('BIC')
title('Relazione BIC-K')

% Figura della verosomiglianza
n = sum(w);
p = 3*K - 1; % numero parametri GMM 1D

logL_from_BIC = (p .* log(n) - BIC) / 2;

figure(10)
plot(K, logL_from_BIC, '-o')
xlabel('K')
ylabel('Log-Likelihood')
title('Relazione Log-Likelihood - K')

```

Il codice è costituito da una fase iniziale di caricamento dei dati e di costruzione dell'istogramma relativo alla distribuzione dei voxel in funzione dei valori di HU, al fine di effettuare una preliminare analisi qualitativa della distribuzione stessa e dell'eventuale presenza di differenti gruppi di voxel.

Successivamente, sono stati preparati gli input da inserire per lo sviluppo del modello, ossia l'estrazione di un campione rappresentativo della popolazione e il numero di gaussiane che la compongono, rappresentato dalla variabile K , indicata come un valore tra 2 e 8. Per ogni valore di K , il modello è stato calcolato attraverso la funzione `fitgmdist` con la quale è stato potuto modellare la distribuzione come la combinazione di più gaussiane, ognuna caratterizzata da media μ , deviazione standard σ e peso π .

Il risultato finale è stato pertanto l'istogramma originale della distribuzione, i parametri di ogni gaussiana per ogni modello sviluppato considerando un valore di K da 2 a 8 e molteplici istogrammi, in quantità pari al valore espresso da K per quel singolo modello.

6.B.2. Codice per il calcolo delle probabilità a posteriori

L'algoritmo esposto in questa appendice è adoperato per il calcolo delle probabilità a posteriori associate a ciascun valore di HU.

Per la corretta esecuzione del codice, sono necessari i risultati della GMM ottenuti mediante l'algoritmo descritto nella Sezione 6.B.1 e successivamente salvati in un apposito file.

Inoltre, il codice richiede esclusivamente la modifica del valore di X, in funzione del numero di gaussiane che si desidera considerare per l'assegnazione dei valori alle rispettive classi.

L'output finale consiste in una tabella in formato csv, dal nome "classi_HU", contenente i valori di HU e la relativa gaussiana di appartenenza.

```
load("MatlabValues.mat")
X= ; % Inserire numero di gaussiane voluto (ATTENZIONE: se si
vogliono inserire 5 gaussiane, ossia K = 5, allora impostare X = 4)

% Estrazione dei parametri delle gaussiane
mu_k = mu{X};
sigma_k = sigma{X};
pi_k = pi_comp{X};

% Inizializzazione
n = length(hu);
K = X+1;
posterior = zeros(n, K);
classe = zeros(n,1);
incerto = zeros(n,1);

for i = 1:n

    x = hu(i);
    valori = zeros(1,K);

    for k = 1:K
        % Calcolo della densità di probabilità per ogni x
        gauss = (1/(sigma_k(k)*sqrt(2*pi))) * ...
            exp(- (x - mu_k(k))^2 / (2*sigma_k(k)^2));

        valori(k) = pi_k(k) * gauss;
    end

    % Calcolo delle probabilità a posteriori
    posterior(i,:) = valori / sum(valori);

    % Verifica della classe di incertezza
    [sorted, idx] = sort(posterior(i,:), 'descend');

    max1 = sorted(1);
    max2 = sorted(2);

    if (max1 - max2) < 0.025
        classe(i) = 0;
        incerto(i) = 1;
    else
```

```
        classe(i) = idx(1);  
    end  
  
end  
  
T = table(hu, classe);  
writetable(T, 'classi_HU.csv');
```

Il codice lavora tramite una prima estrazione dei parametri caratteristici di ciascuna componente gaussiana, ossia media, deviazione standard e peso statistico.

Dopo l'inizializzazione delle variabili fondamentali, per ciascun valore vengono calcolate le densità di probabilità associate alle diverse gaussiane e, a partire da queste, le corrispondenti probabilità a posteriori. Il valore di HU viene quindi assegnato alla gaussiana con probabilità maggiore, solo se la differenza tra le due probabilità più elevate risulti superiore alla soglia impostata (2,5%), condizione che identifica una classificazione incerta del dato.

Infine, i risultati vengono raccolti in una tabella ed esportati in formato csv

7. GUIDA PER LA REALIZZAZIONE IN PROPRIO DEL LAVORO: metodologia di analisi delle μ CT

La presente sezione descrive, in ordine cronologico, tutti i passaggi eseguiti durante l'intero processo di analisi delle μ CT e di progettazione della gabbia per la rigenerazione ossea. L'obiettivo è fornire uno sviluppo metodologico chiaro, schematico e dettagliato delle operazioni adottate, così da consentire la replicabilità dell'analisi da parte di altri operatori.

In generale, siccome questo tipo di lavorazione è computazionalmente elevato, sono riscontrabili errori di “*Out of memory*”, soprattutto nelle fasi su *3D Slicer*. Se ciò dovesse accadere, è necessario pulire la RAM, chiudere il software di lavoro e ripetere l'operazione che ha causato il guasto.

7.1. Individuazione dei punti su 3D Slicer

Il lavoro inizia con l'analisi delle micro CT mediante il software *3D Slicer*. Dopo aver avviato il programma, selezionare il pulsante “*Data*”, situato nella parte superiore sinistra dell'interfaccia utente (Fig.48a). Si aprirà una finestra; premere “*Choose Directory to Add*” (Fig.48b) e selezionare la cartella contenente le immagini microtomografiche da importare. Infine, confermare l'operazione premendo “*OK*” (Fig.48c) e attendere la fine del caricamento. Non appena il loading sarà terminato, osservare il volume microtomografico, ottenendo una migliore visualizzazione mediante la *window width/level* e il *threshold*, modificabili nel modulo “*Volumes*” (Fig.48d).

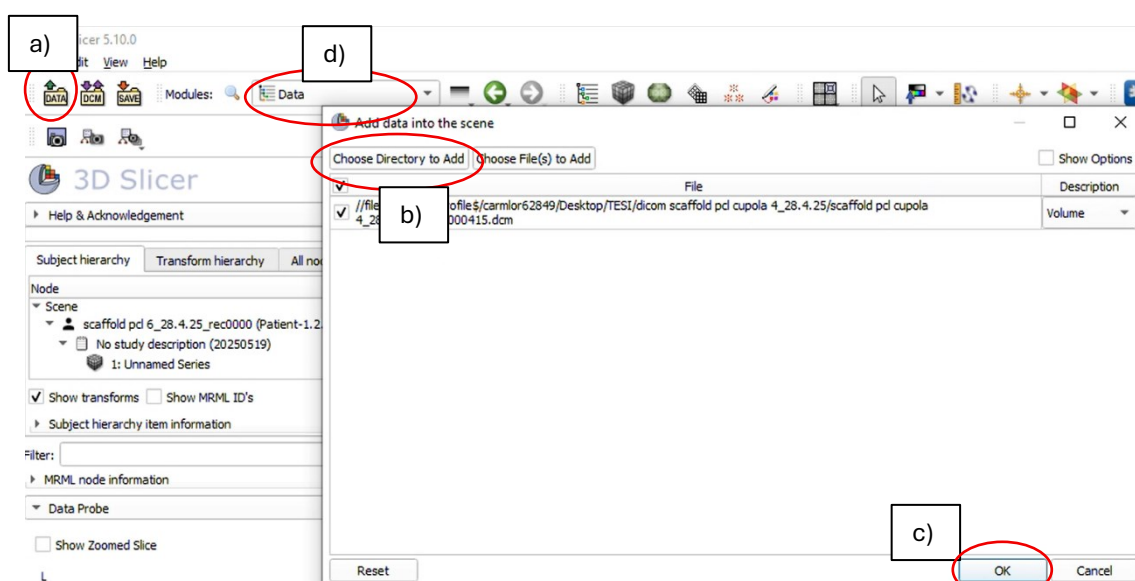


Figura 48: Data (a); Choose Directory to Add (b); OK (c); Elenco a tendina coi moduli (d)

Per procedere con l'allineamento, aprire il modulo “*Markups*” selezionandolo dal menu a tendina nell'interfaccia di 3D Slicer (Fig.49a). Successivamente, premere “*Point List*” che permette di creare una nuova lista di punti di riferimento (Fig.49b). Quindi, posizionare il primo punto utile all'allineamento. I successivi possono essere aggiunti utilizzando uno dei comandi evidenziati nella figura 49c ed essere posizionati nella localizzazione desiderata all'interno della scena tomografica, utilizzando i cursori delle tre viste ortogonali (assiale, coronale e sagittale) per individuare con precisione le coordinate volute.

Allo scopo di visualizzare e verificare i punti già inseriti, è possibile aprire la sottosezione “*Control Points*” all'interno del modulo “*Markups*”, dove vengono elencati tutti i punti creati con le relative coordinate (Fig.49d).

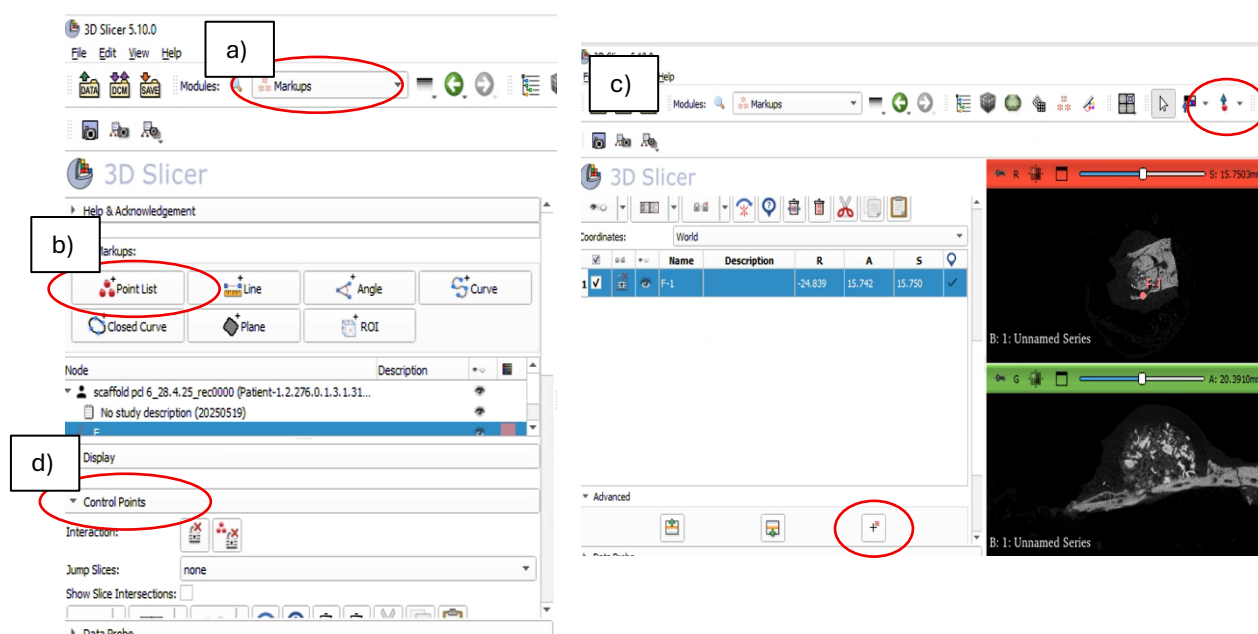


Figura 49: *Markups* (a); *Point list* (b); *Control points* (c); *Add points* (d)

Al termine del posizionamento dei punti, procedere con l'esportazione della tabella utilizzando la sottosezione “*Export/Import Table*”, situata poco sotto i “*Control Points*”. Prima del dare conferma, però, assicurarsi di selezionare l'opzione “*Create new table*” nel campo “*Output table*” e l'opzione “*LPS*” nel campo “*Coordinate system*” (Fig.50). A conferma avvenuta, nel modulo “*Data*”, comparirà una nuova tabella, all'interno della quale saranno contenute le coordinate dei nodi inseriti. A questo punto, premere col tasto destro del mouse sulla tabella, cliccare “*Export to file*”, selezionare il formato csv e salvare la tabella nella cartella desiderata.

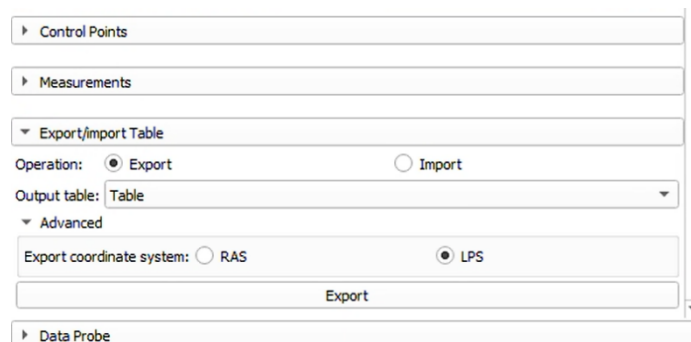


Figura 50: Export table

7.2. Allineamento su Rhinoceros 3D

Lo step successivo consiste nell'aprire il file "roi.3dm", che farà avviare in automatico il software *Rhinoceros 3D*. Al suo interno sono presenti la mesh della cupola e una polisuperficie che identifica lo stesso volume. Dunque, cliccare nel menu in alto a sinistra "File", "Importa", selezionare il file csv precedentemente creato e aprirlo. Nella finestra di importazione che si aprirà subito dopo, impostare la virgola come delimitatore e premere "OK". I punti verranno così caricati mantenendo le coordinate originali.

In seguito, selezionare i nodi con il tasto sinistro del mouse, aprire il menu a tendina del comando per la creazione dei cerchi, situato nella parte sinistra dell'interfaccia (Fig.51a), e selezionare l'opzione "Cerchio: adatta punti" (Fig.51b). In questo modo verrà creato un cerchio interpolato tra i punti selezionati.

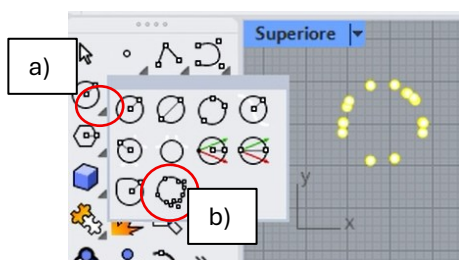


Figura 51: Cerchio (a); Cerchio: adatta punti (b)

Procedere quindi con l'allineamento utilizzando il comando "Orienta oggetti: 3 punti" (Fig.52). Dopo aver attivato il comando, seguire le indicazioni fornite dal software. La procedura richiede di selezionare l'oggetto da allineare, ossia la polisuperficie, individuare tre punti di riferimento (si consiglia il centro della base e due punti sulla circonferenza, scelti in

modo che i raggi formino un angolo retto)(Fig.53a) e successivamente i tre punti corrispondenti sul cerchio di destinazione (Fig.53b). Infine, confermare l'operazione per completare l'allineamento.

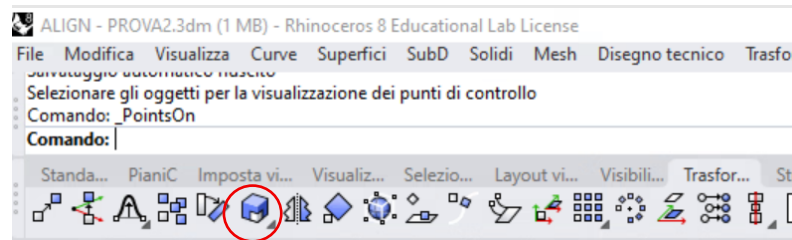


Figure 52: Orienta Oggetti: 3 punti (attivabile col tasto destro del mouse)

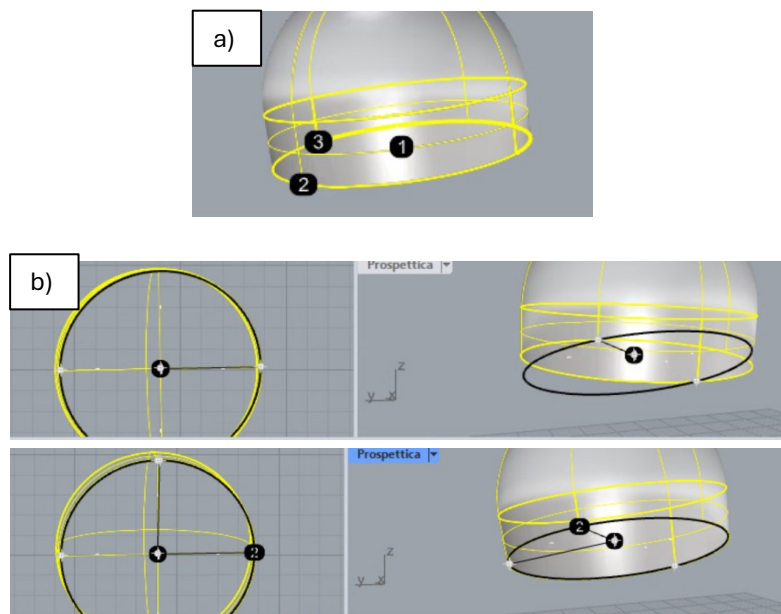


Figura 53: tre punti sulla base della mesh (a); allineamento col cerchio interpolato (b)

Il passaggio successivo consiste nella conversione della polisuperficie in mesh. Per farlo, selezionare “Strumenti Mesh” (Fig.54a) e successivamente “Mesh da superfici/polisuperfici” (Fig.54b). Cliccare quindi sulla geometria da convertire e confermare i parametri proposti nella finestra che compare, lasciandoli invariati. Al termine dell'operazione verrà generata una nuova mesh.

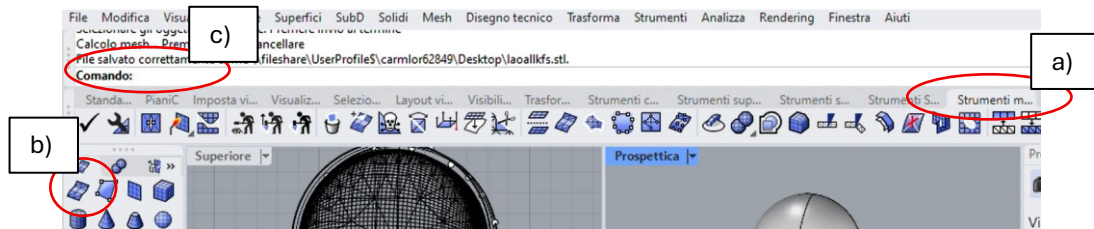


Figura 54: Creazione mesh; Strumenti mesh (a); Mesh da superficie/polisuperficie (b); barra dei comandi

Successivamente, tramite la barra dei comandi (Fig.54c), cercare ed applicare il comando “*UnificaNormaliMesh*”. Selezionare quindi la mesh appena creata e premere *Invio*.

Questi ultimi due passaggi descritti sono stati introdotti poiché l’esportazione diretta della polisuperficie in formato stl, comportando una conversione automatica in mesh durante il salvataggio, generava spesso problemi in fase di importazione su *3D Slicer* e la mesh veniva letta erroneamente. Dunque, si è fatto ricorso a dei passaggi espliciti per non incorrere in tali problematiche.

Dopo aver eseguito il comando “*UnificaNormaliMesh*”, la struttura è pronta per essere esportata. Selezionare perciò “*File*”, “*Esporta selezione*”, scegliere la mesh e verificare che il formato selezionato sia stl. Dopo la conferma, comparirà una finestra contenente le opzioni di esportazione; lasciarle invariate e premere OK.

7.3. Verifica su 3D Slicer ed eventuali correzioni

Il passo successivo del lavoro consiste nel caricamento su *3D Slicer* della mesh allineata per verificarne l’orientamento. Sul software appena menzionato, come in precedenza, cliccare “*Data*” in alto a sinistra nell’interfaccia, continuare con “*Choose File(s) to Add*” e selezionare la mesh, navigando nelle proprie risorse.

A scopo di visualizzazione, una volta importata la mesh, è consigliabile fare clic con il tasto destro sull’icona a forma di occhio posta accanto al file appena caricato (Fig.55a) e attivare l’opzione “*2D visibility*” (Fig.55b). In questo modo, il file stl sarà visibile anche nelle tre viste bidimensionali (assiale, coronale e sagittale).

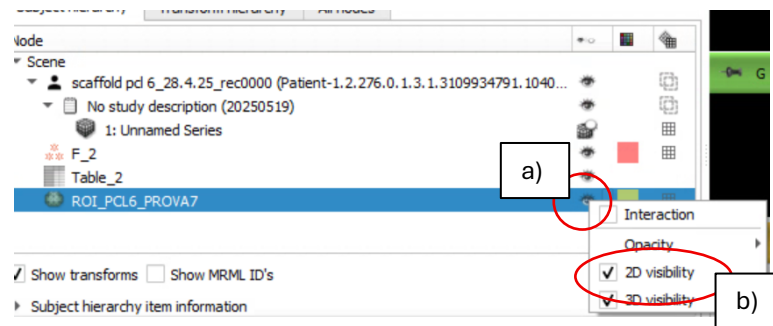


Figura 55: 2D visibility

A seguito del controllo, se l'allineamento non fosse andato a buon fine, è necessario intervenire adottando una delle due soluzioni seguenti: ripetere l'allineamento tramite una nuova selezione dei punti sulle microtomografie, oppure eseguire un *offset* della mesh verso l'interno, così da ridurre il rischio di errori dovuti a eventuali imprecisioni di allineamento. Seguendo la seconda via, si evita la selezione di voxel esterni alla regione di interesse che potrebbero influenzare i risultati delle analisi statistiche.

Se la scelta ricadesse sull'*offset*, occorre intervenire su *Rhinoceros 3D* seguendo gli step di seguito illustrati. Mediante la barra dei comandi presente nella parte superiore dell'interfaccia (Fig.56a), richiamare il comando "*OffsetSrf*" e, una volta avviato, selezionare successivamente la polisuperficie allineata. Compariranno delle frecce orientate verso l'esterno della geometria, che indicano la direzione in cui verrà generata la nuova superficie (Fig.56b). Inoltre, nella barra dei comandi saranno visualizzati diversi parametri (Fig.56c), di cui di nostro interesse sono:

- "*Distanza*", che rappresenta la distanza di offset rispetto alla polisuperficie originale; modificarlo cliccandolo ed inserendo una misura adeguata per escludere le imprecisioni (es.0,4mm);
- "*Inverti tutto*", che consente di invertire la direzione delle frecce; cliccarlo per convertire l'offset verso interno.

A questo punto, premere *Invio* per confermare l'operazione e generare la nuova polisuperficie offsettata verso l'interno.

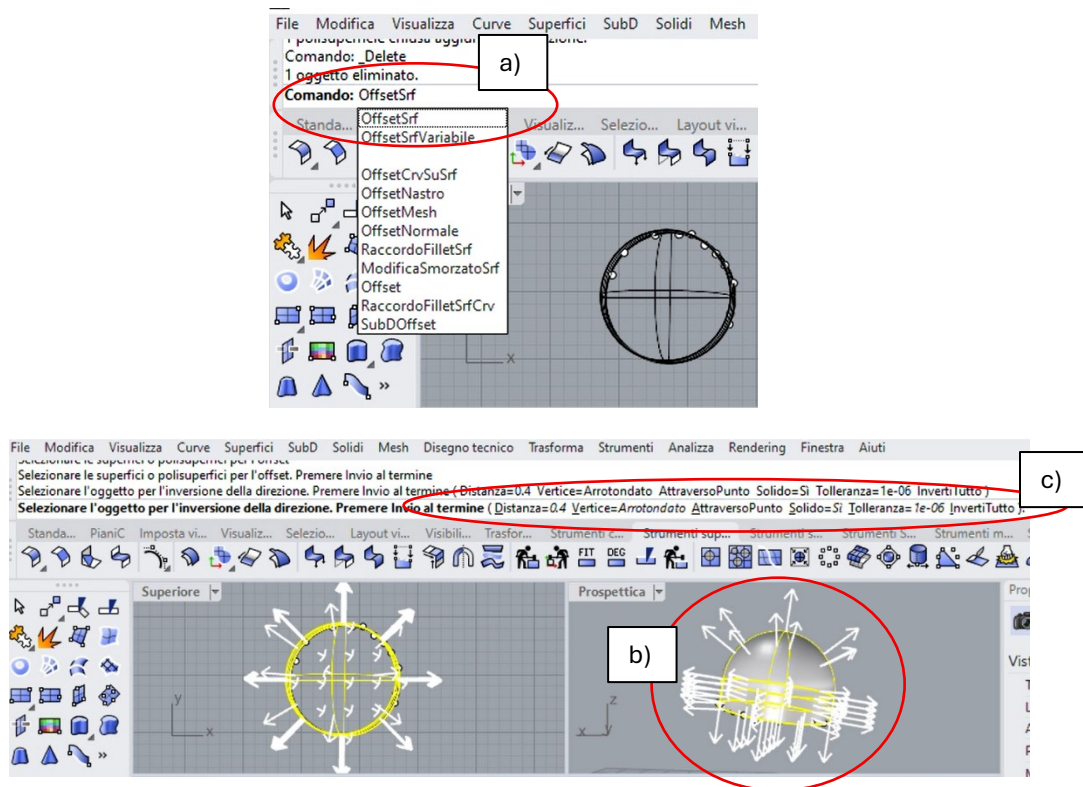


Figura 56: Offset Surface; comando *OffsetSrf* nella barra dei comandi (a); frecce indicanti la direzione dell'offset (b); opzioni di offset (c)

A seguito di ciò, ripetere gli step eseguiti in precedenza per esportare la mesh e ricaricarla su *3D Slicer*.

7.4. Estrazione dei valori di HU su 3D Slicer

A seguito delle eventuali correzioni, quando la mesh risulterà orientata in modo soddisfacente, lo step seguente consiste nell'utilizzo dei primi codici su *3D Slicer* attraverso il linguaggio di programmazione *Python* interno. Per aprire la console di programmazione, è necessario selezionare, nella parte superiore destra dell'interfaccia, il pulsante contrassegnato dal logo di Python (Fig.57a). In questo modo verrà visualizzata, nella parte inferiore della schermata, la console del software di programmazione (Fig.57b).

Dunque, è sufficiente copiare e incollare i codici 6.A.1 e 6.A.2, uno dopo l'altro, avendo cura di modificarli dove serve. A tal proposito, si raccomanda di leggere i dettagli associati a ciascun codice, inseriti nella loro sezione dedicata.

Se l'esecuzione degli algoritmi è andata a buon fine, verrà generata una “*Segmentation*” contenente un segmento denominato “*ROI*”, visualizzato in rosso, e verrà inoltre creata una tabella contenente i valori di HU estratti dal volume di interesse.

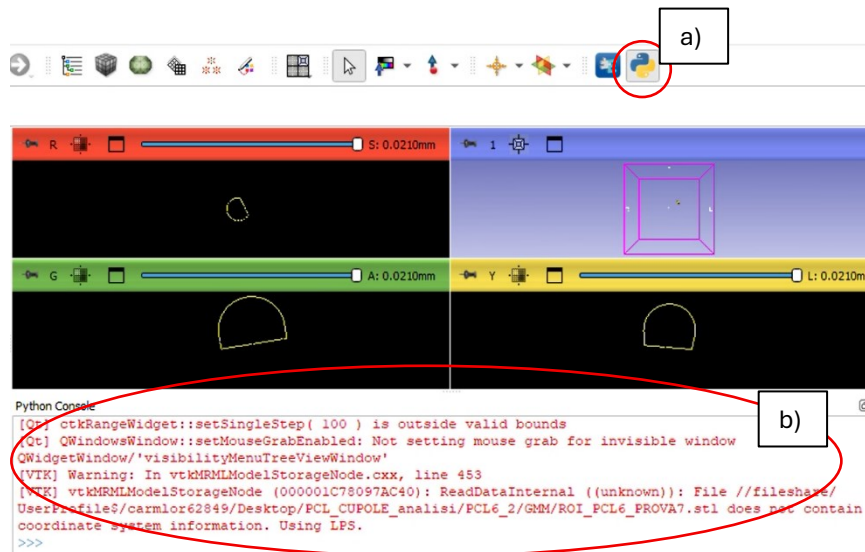


Figura 57: comando per l'attivazione della console Python (a); Console Python (b)

Raggiunta questa fase, analogamente a quanto fatto in precedenza con la tabella derivata dalla lista dei punti, è necessario esportare la tabella contenente i valori di HU. Il file deve essere esportato come tsv, poiché il software successivo, *Matlab*, potrebbe non interpretare correttamente il formato csv.

7.5. GMM su Matlab

Si procede quindi all'analisi GMM. Aprire il software *Matlab* e, al suo interno, selezionare l'icona della cartella contrassegnata dalla freccia verde. In questo modo verrà impostato come ambiente di lavoro la directory contenente il file tsv appena esportato (Fig.58a). Il contenuto della cartella verrà visualizzato a sinistra, nella finestra di lavoro del software. Fare clic con il tasto destro sulla tabella (Fig.58b) e selezionare il comando “*Import Data...*” (Fig.58c). Si aprirà la finestra dedicata all'importazione dei dati, dove sarà sufficiente confermare l'operazione premendo la spunta verde situata in alto a destra. Al termine dell'importazione, la tabella verrà caricata nel *Workspace* di Matlab e sarà pronta per essere utilizzata.

In successione, creare un nuovo script, selezionando il pulsante “*New Script*” (Fig.58d), nel quale dovrà essere incollato il codice 6.B.1. Come coi codici precedentemente utilizzati, porre attenzione alle opportune modifiche per il corretto funzionamento dello stesso.

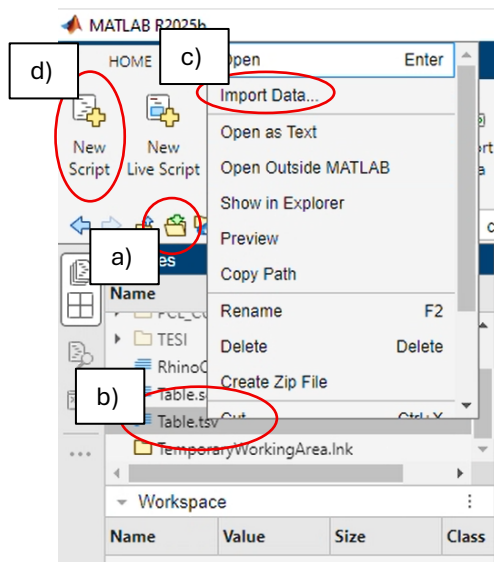


Figura 58: importazione cartella (a); nome della tabella (b); Import data (c); New Script (d)

Infine, premere “*Run*” nell’angolo superiore destro dell’interfaccia e, dopo il salvataggio richiesto all’interno della stessa cartella del file tsv, il codice inizierà a girare. Se tutti i passaggi sono stati eseguiti correttamente, il codice verrà eseguito e genererà gli output previsti. In base alla quantità di informazioni estrapolate dalla micro CT, esso impiegherà più o meno tempo.

Al termine dell’esecuzione, salvare il *Workspace* puntando il cursore su una qualsiasi variabile, premendo il tasto destro del mouse e successivamente “*Save Workspace*” (Fig.59).

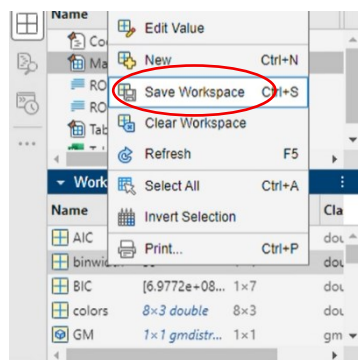


Figura 59: Save Workspace

Questa operazione genera un file contenente tutte le variabili presenti nell'ambiente di lavoro. Oltre a ciò, salvare tutti i grafici rappresentanti le componenti gaussiane, BIC e Log-likelihood.

Si precisa che i risultati ottenuti rappresentano i parametri del modello statistico e non i risultati dell'analisi sui tessuti delle μ CT. Questi ultimi verranno determinati successivamente in 3D Slicer nel modulo dedicato.

Allo stesso modo di poco fa, aprire un nuovo script, copiare il codice 6.B.2. adibito al calcolo delle probabilità a posteriori e premere “Run”. Il codice in questione creerà in automatico, nella directory di riferimento, una tabella dal nome “classi_HU” in formato csv contenente le assegnazioni di ogni HU alle rispettive gaussiane. Come da indicazioni nell'appendice relativa all'algoritmo 6.B.2, si rammenta di modificare a piacimento il valore di X che definisce il numero K di gaussiane in cui suddividere il dataset.

7.6. Creazione dei segmenti volumetrici su 3D Slicer e analisi statistica

L'ultima fase consiste nella creazione dei segmenti su *3D Slicer* mediante il codice 6.A.3 e l'estrazione dei dati statistici per ciascun segmento. Analogamente a quanto descritto per i codici 6.A.1 e 6.A.2, è necessario aprire la console *Python*, copiarvi il programma menzionato ed eseguirlo. Per i requisiti di utilizzo, si rimanda al capitolo delle appendici dell'omonimo codice.

A scopo visualizzativo, è possibile attivare o disattivare i singoli segmenti tramite l'icona dell'occhio associata a ciascuno di essi. Inoltre, il colore dei segmenti può essere modificato facendo doppio clic sul relativo quadrato colorato (Fig.60a) e selezionando successivamente l'opzione “Color” (Fig.60b).

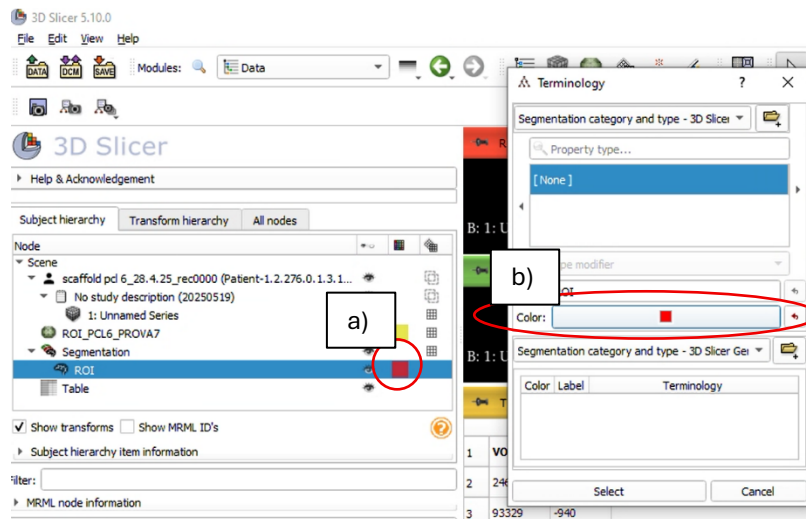


Figura 60: quadrato indicante il colore (a); Color (b)

Per completare l'analisi e ottenere i dati statistici dei segmenti volumetrici, utilizzare il modulo “*Segment Statistics*” tramite la barra di ricerca dei moduli già usata. Una volta aperto il modulo, impostare la segmentazione nell'apposito campo “*Segmentation*” e il volume della micro-CT nel campo “*Scalar volume*”. Eventualmente è possibile espandere la sottosezione “*Advanced*” per selezionare i parametri statistici di interesse. Infine, premere “*Apply*” per generare una tabella contenente i risultati. La tabella ottenuta può quindi essere esportata utilizzando le stesse modalità descritte in precedenza in questo paragrafo.

8. GUIDA PER LA REALIZZAZIONE IN PROPRIO DEL LAVORO: protocollo di modellazione di una gabbia paziente specifica per la rigenerazione ossea

La presente sezione descrive, in ordine cronologico, tutti i passaggi eseguiti durante l'intero protocollo di progettazione di una gabbia paziente specifica per la rigenerazione ossea.

8.1. Lavorazioni delle CT su 3D Slicer

La seconda parte del presente lavoro di tesi, inerente lo sviluppo della gabbia GBR, ha come primo step l'importazione su *3D Slicer* della CT del paziente; dunque, come per le analisi microtomografiche, premere: “Data”, “Choose Directory to Add”, selezionare la cartella contenente le immagini tomografiche ed infine “OK”. Porre attenzione al fatto che alcune CT possono contenere diverse *Series*; pertanto, oltre all'importazione, è necessario selezionare successivamente la serie da caricare. Nel presente lavoro erano disponibili serie assiali, coronali, sagittali, multiplanari e scout. È stata utilizzata una serie assiale, poiché veniva caricata senza errori ed era facilmente analizzabile (Fig.61).

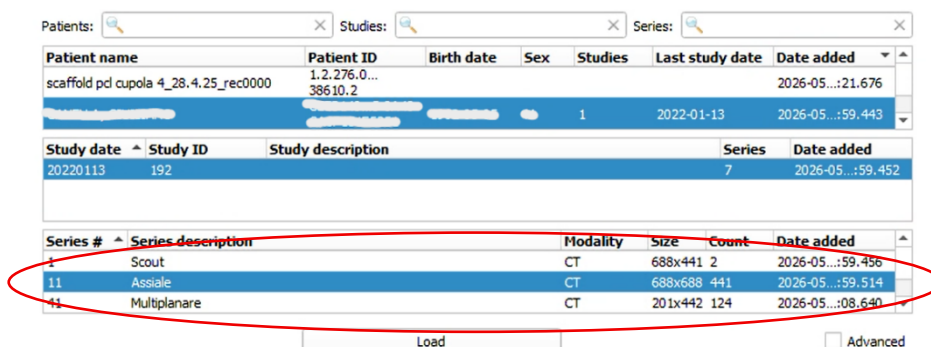


Figura 61: dettaglio sulle serie di una CT

Una volta eseguita l'importazione, giocare con i cursori di *window width/level* e *threshold* nel modulo “*Volumes*” per analizzare la CT.

Rispetto ad una μ Ct che è più pesante, una CT clinica permette l'utilizzo di un maggior numero di strumenti utili per lavorare direttamente sul volume tomografico. Tra di essi è disponibile il “*Volume Rendering*”, una funzione utile per la visualizzazione tridimensionale delle immagini. In questo modulo è possibile attivare la visualizzazione 3D del volume accendendo l'icona dell'occhio in corrispondenza della voce “*Visibility*”, selezionare un preset per evidenziare

specifiche componenti anatomiche di interesse e, tramite il cursore “*Shift*”, regolare la soglia di visualizzazione, spostandosi all’interno della distribuzione dei valori di HU presenti nei voxel (Fig.62).

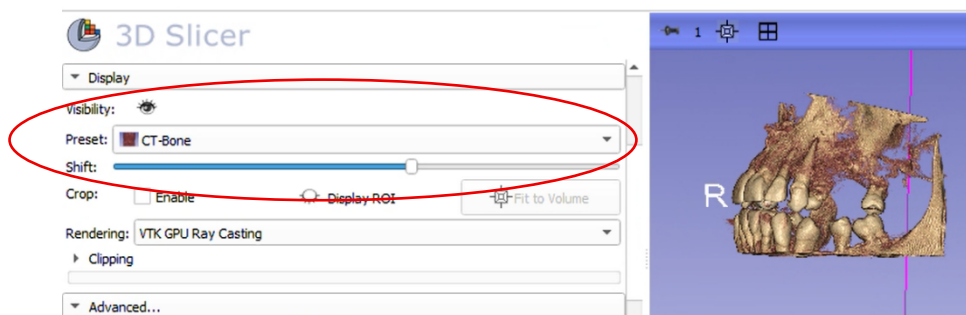


Figura 62: Visibility; Preset; Shift

In alternativa, nella sottosezione “*Advanced*” del “*Volume Rendering*” è possibile intervenire in modo più preciso sui parametri di visualizzazione, modificando il “*Threshold*”, “*Opacity*”, il profilo di visualizzazione (ad esempio impostandolo a gradino) e lo “*Scalar Color Mapping*” (Fig.63).

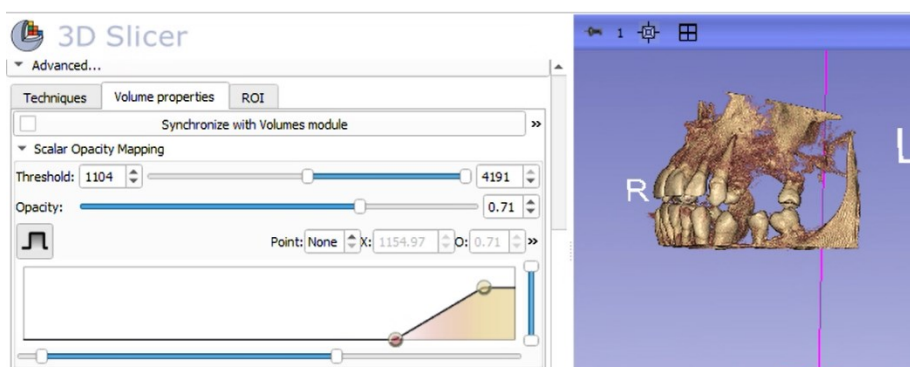


Figura 63: Threshold; Opacity; profilo di visualizzazione

Prima di procedere con la segmentazione, può essere utile ritagliare il volume per ridurre l’area di lavoro. Per farlo, cercare il modulo “*Crop Volume*” tramite la lente di ingrandimento (Fig.64a) e cliccare “*Switch to module*”. Al suo interno, verificare che il volume corretto sia impostato in “*Input Volume*”, quindi creare una nuova ROI selezionando “*Create New ROI*” in “*Input ROI*”. Posizionare e modificare la regione sulla scena in modo da includere le parti di

interesse. Infine, premere “*Apply*” (Fig.64). Si otterrà così un nuovo volume contenente esclusivamente la porzione selezionata.

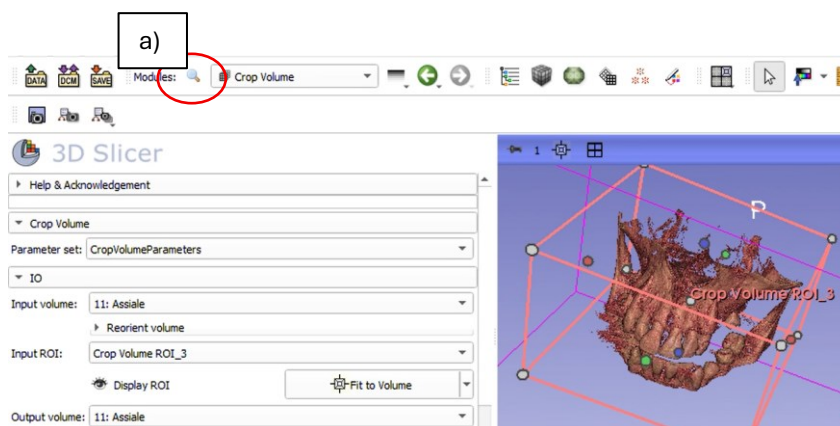


Figura 64: Crop Volume; lente di ricerca (a)

Terminata questa operazione, si può proseguire con la segmentazione della componente obiettivo, aprendo il modulo “*Segment Editor*” e premendo “*Add*”, in modo da creare una nuova segmentazione inizialmente vuota (Fig.65a). Successivamente, utilizzando il comando “*Threshold*” (Fig.65b), selezionare solo i voxel compresi in uno specifico intervallo di valori di HU, al fine di isolare le componenti tissutali di interesse. Essendo il tessuto osseo il nostro obiettivo, è utile impostare un livello di *Threshold* elevato, tale da considerare solo i tessuti altamente radiografici. A scopo pratico, durante l’applicazione del comando, diversi materiali presenti nella scena verranno evidenziati in verde. Questa visualizzazione consente di identificare quegli elementi che verranno mantenuti in seguito all’applicazione della soglia.

La segmentazione risultante può essere poi rifinita nel medesimo modulo mediante gli strumenti messi a disposizione (Fig.65c). Tra di essi si consiglia l’utilizzo di:

- “*Scissors*” per ritagliare a piacimento la segmentazione;
- “*Smoothing*” per ridurre le irregolarità in punti specifici;
- “*Keep Selected Island*” al fine di mantenere solo una componente selezionata;
- “*Keep Largest Island*” con lo scopo di mantenere la porzione più grande, eliminando le più piccole slegate da essa;
- “*Paint*” per aggiungere parti della mesh non selezionate dal threshold iniziale.

Attraverso questi strumenti, si ottiene il segmento di interesse ripulito e pronto da utilizzare nelle analisi successive.

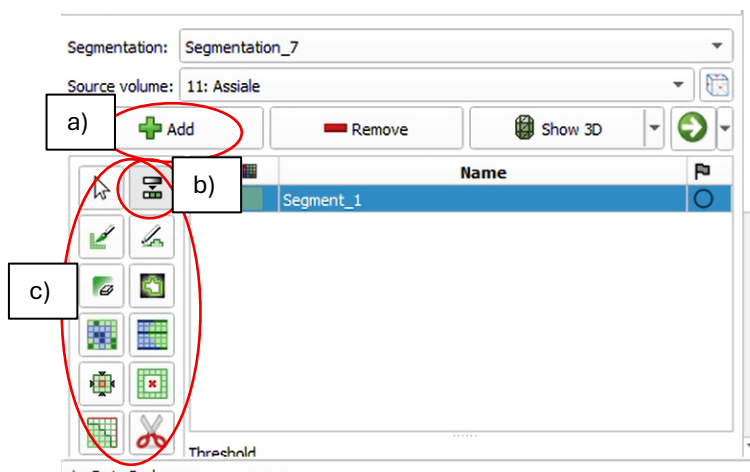


Figura 65: Segment editor; Add (a); Threshold, Paint, Scissors, Islands, Smoothing (b)(c)

Quando l'elaborato risulterà soddisfacente, andare nel modulo “Data”, premere il tasto destro sul *segment* e in successione “Export visible segments to model”. All'interno dei Data verrà creata una cartella contenente il modello del segmento realizzato. Su quest'ultimo, cliccare col tasto destro, “Export to file...”, modificare il formato in stl ed infine cliccare su “Export”. Se tutti i passaggi sono stati eseguiti correttamente, quanto ottenuto è una mesh stl pronta per essere lavorata su altri software.

8.2. Modellazione della gabbia

I passaggi successivi verranno eseguiti nel software *Geomagic Design X*; pertanto, aprire il programma per continuare con la procedura. Una volta aperto il software, cliccare su “Import” in alto a sinistra, individuare la mesh stl creata sul software precedente, selezionarla e premere “Import Only”. Il file verrà quindi caricato e visualizzato nella scena.

8.2.1. Primo metodo

Il primo metodo, basato sulle superfici, prevede inizialmente l'individuazione di una regione della mesh in corrispondenza del difetto osseo. A tal fine, selezionare “Lasso Selection Mode” nella barra degli strumenti (Fig.66a). Tenendo premuto il tasto sinistro del mouse sulla scena, sarà possibile selezionare una regione con una forma personalizzata direttamente sulla mesh. Prima di procedere, però, verificare che l'opzione “Visible Only” sia attiva. In questo modo, la

selezione verrà applicata esclusivamente alle facce visibili della mesh, evitando di includere anche le superfici nascoste (Fig.66b). Definire quindi una prima area di interesse e, mantenendo premuto il tasto “*Maiusc*”, aggiungere ulteriori porzioni alla stessa selezione. Ruotare progressivamente la mesh e selezionare le aree adiacenti fino a ottenere la regione voluta. Nel caso in cui si sbagliasse nella definizione della regione, tenendo premuto “*Ctrl*” si otterrà l’operazione opposta al “*Maiusc*” (Fig.66).

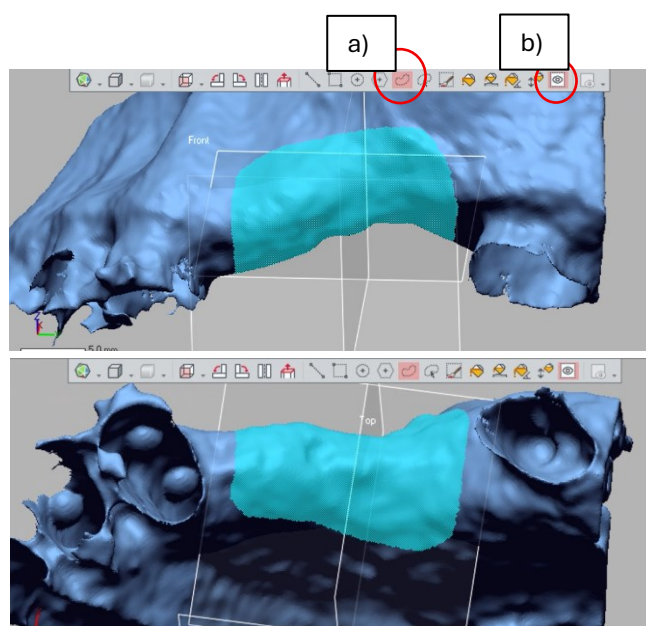


Figura 66: Definizione della regione; Lasso Selection Mode (a); Visible Only (b)

Quando la selezione risulta adeguata, inserire la regione mediante il comando “*Insert*”, posizionato in alto, nel modulo “*Region*” (Fig.67).

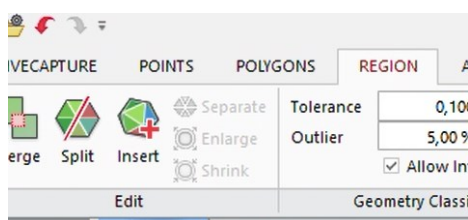


Figura 67: Region; Insert

A questo punto, aprire il modulo “*Model*” situato in alto e successivamente cliccare il comando “*Loft Wizard*”, strumento adibito alla generazione automatica di una superficie

composta da una serie di curve guida chiamate loft, costituite da punti di controllo. Si aprirà quindi, sulla scena, una sezione con diverse indicazioni.

Con il cursore, selezionare la regione inserita in precedenza e premere la freccia direzionata verso destra, posta a fianco del nome dell'operazione (Fig.68a). Comparirà una piccola sezione in cui è possibile modificare il numero di control points delle loft. Il numero di control points è determinante in quanto essi descrivono la forma della superficie creata e ne permettono la modellazione geometrica poiché, modificandone manualmente la posizione, la configurazione della superficie può essere variata. Una volta scelto il numero desiderato, confermare cliccando sul check.

In questo modo verrà creato un “3D Sketch” e una “Surface Body”, visibili sulla scena e nell'albero del modello (Fig.68b). Attraverso quest'ultimo, fare doppio clic sullo sketch per visualizzare i punti di controllo e le loft che descrivono la superficie.

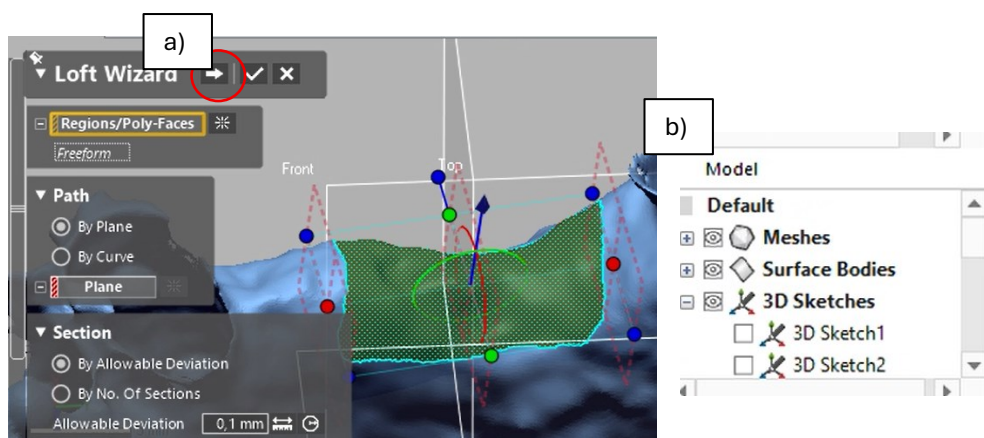


Figura 68: Loft Wizard; freccia di conferma (a); albero del modello (b)

Saranno quindi visibili le loft con i relativi control points (Fig.69). Da qui, l'operazione consiste nel traslare tali punti verso l'esterno della mesh anatomica per ottenere la forma desiderata e riempire il volume. Al fine di facilitarne la modifica, si consiglia di attivare il “Filter Vertices” (Fig.69a) in modo da poter muovere più agilmente i punti. Dunque, selezionare e spostare i punti nella posizione desiderata. Questa operazione consente la generazione di una struttura che si sviluppa esternamente rispetto al difetto osseo e che pertanto chiude virtualmente la lacuna.

In aggiunta, affinché la superficie finale possa rimanere a contatto con la geometria, è necessario vincolare gli estremi delle loft alla mesh. Per eseguire ciò, è consigliato utilizzare il

comando “*Project*” (Fig.69b), il quale consente di inserire i punti di interesse in “*Curve Nodes*” e la mesh di riferimento in “*Target Entity*” (Fig.69c).

Una volta completate le modifiche ai control points, confermare il 3D Sketch per aggiornare la superficie con la nuova geometria, mediante il tasto “*Exit*” posto in alto a sinistra.

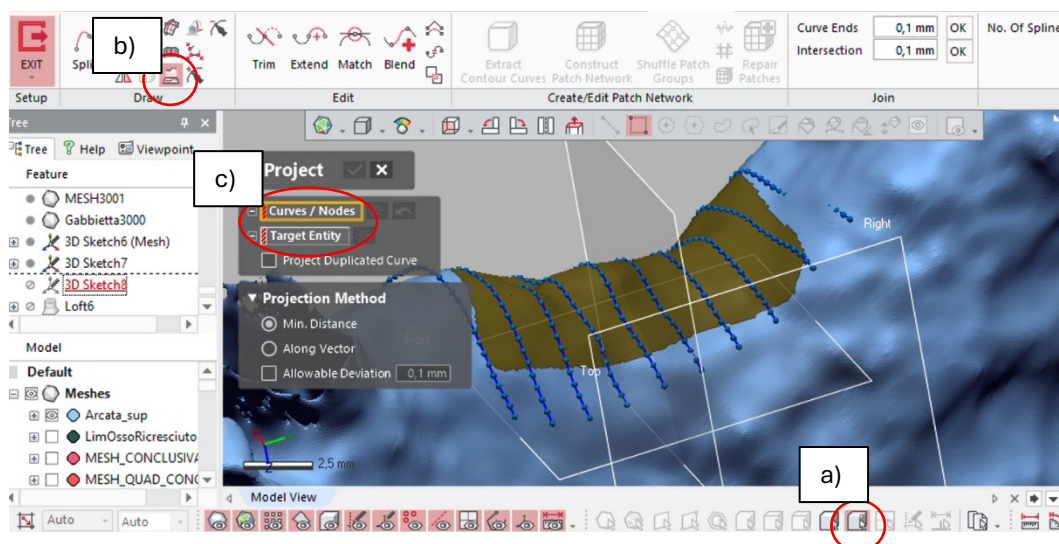


Figura 69: Modifica delle loft; Filter Vertices (a); Project (b); Curve Nodes / Target Entity (c)

Quando si sarà ottenuta una superficie soddisfacente, è possibile procedere alla sua rifinitura per la rimozione di porzioni indesiderate come angoli vivi ed aree in eccesso. Per farlo, accedere nuovamente al modulo “*3D Sketch*” (Fig.70a) e premere l’icona della matita con i tre assi in alto a sinistra. Attraverso il comando “*Spline*” (Fig.70b), disegnare una curva 3D lungo la zona da rifilare, come mostrato in figura 70.

Dopo aver dato conferma ed essere usciti dallo sketch, aprire il menu “*Model*”, selezionare “*Edit*” (Fig.70c) e di seguito “*Trim Surface*” (Fig.70d). Come “*Tool Entities*” selezionare la geometria appena creata e come “*Target Body*” la superficie da modificare (Fig.70e). Confermare la selezione tramite la freccia direzionata verso destra, scegliere la porzione di superficie da mantenere e confermare l’operazione. La superficie verrà così rifilata secondo il profilo definito dalla spline, eliminando eventuali porzioni indesiderate e spigoli vivi.

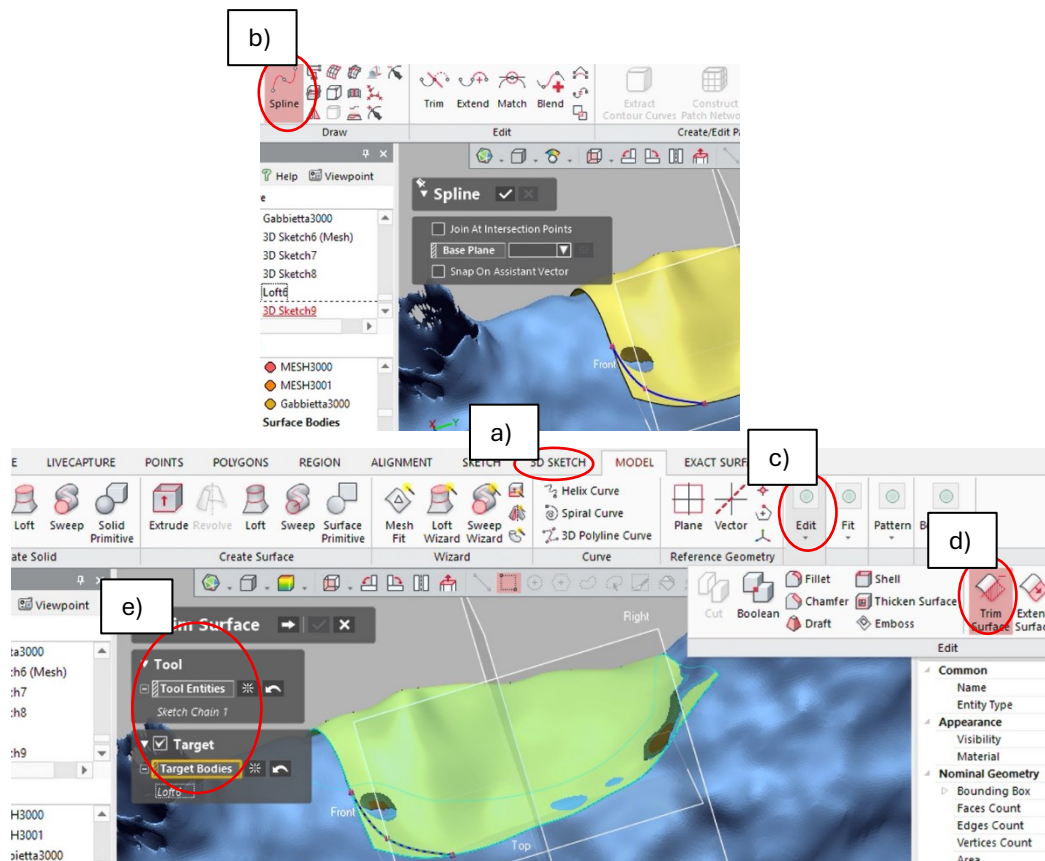


Figura 70: Rifinitura; 3D sketch (a); Spline (b); Edit (c); Trim Surface (d); Tool Entities e Target Bodies (e)

Si può dunque procedere all'ultimo step di conversione in mesh aprendo il modulo “Polygons” e cliccando “Convert To Mesh” (Fig.71a). Si aprirà una sezione sulla scena in cui ne verrà chiesto il target; selezionare la superficie appena ritagliata e confermare. Quanto ottenuto è una mesh modellata, rifinita e personalizzata, capace di racchiudere il volume del difetto, mantenendo il contatto con la morfologia ossea.

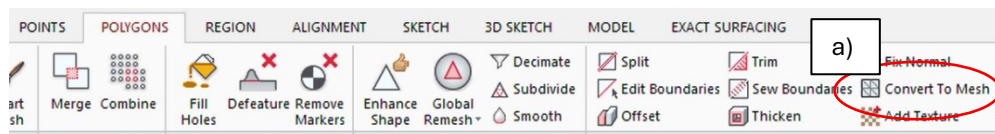


Figura 71: Polygons e Convert To Mesh (a)

Infine, premere il tasto destro del mouse sulla mesh nell'albero del modello, cliccare “Export” e salvare il file in formato stl.

8.2.2. Secondo metodo

Il secondo metodo prevede come primo passaggio un'operazione opzionale di ritaglio della mesh anatomica, al fine di ottenere una porzione di mesh più piccola e più lavorabile. Questo passaggio consente di isolare la regione anatomica di interesse ed escludere le aree esterne non necessarie alle operazioni successive. Per eseguirla, accedere al modulo “*Sketch*” e selezionare il comando “*Mesh Sketches*” in alto a sinistra, rappresentato da una matita e una forma triangolare. Successivamente, scegliere il piano su cui creare lo sketch e confermare.

A questo punto, disegnare una geometria di taglio, ad esempio un rettangolo con il comando apposito (Fig.72a), quindi confermare lo sketch e uscire tramite “*Exit*”.

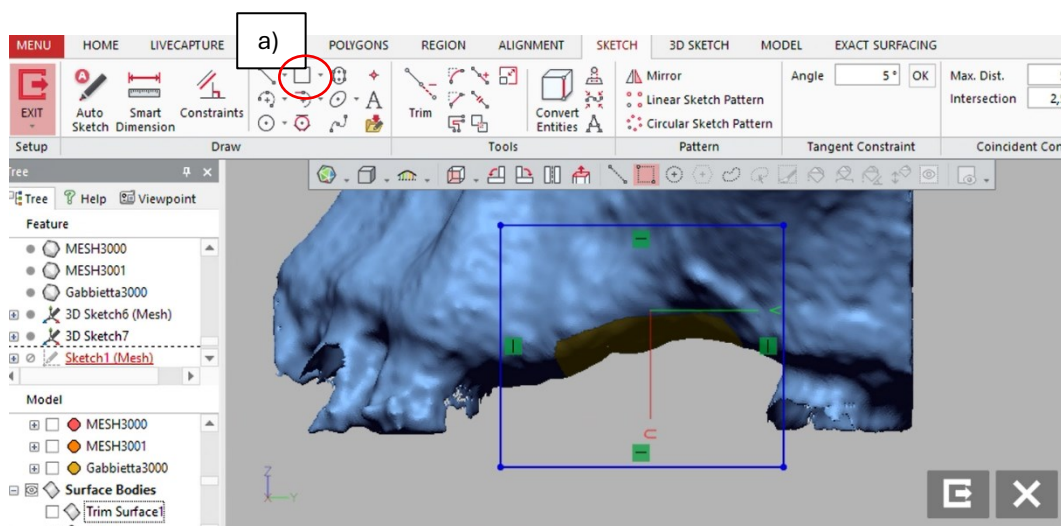


Figura 72: Disegno per il taglio; comando per creare la geometria rettangolare (a)

Accedere al modulo “*Model*” e cliccare il comando “*Extrude*” (Fig.73a). Selezionare la geometria rettangolare e trascinare la freccia blu fino a creare un prisma che intersechi la mesh anatomica. Una volta ottenuto il volume desiderato, confermare l'operazione (Fig.73).

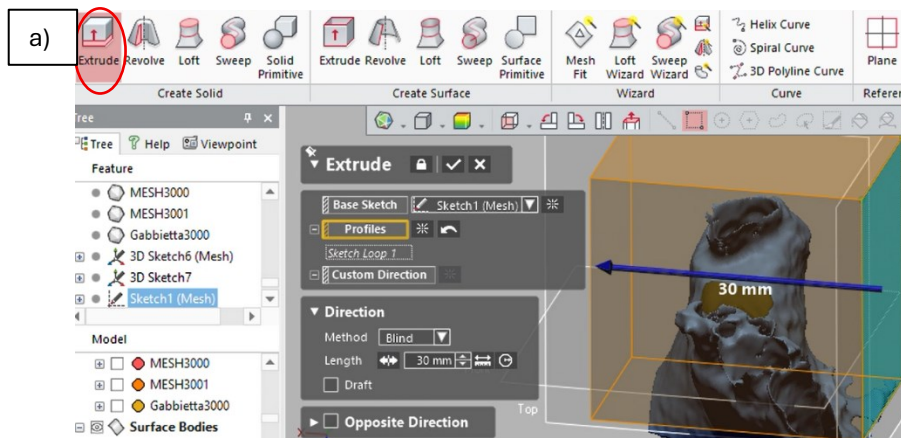


Figura 73: Estrusione (a)

Il prisma generato è un solido e deve essere convertito in mesh per utilizzarlo negli step successivi. Procedere dunque come in precedenza col comando “*Convert To Mesh*” nel modulo “*Polygons*”.

In seguito, restando nello stesso modulo, selezionare il comando “*Boolean*” (Fig.74a) e impostare l’operazione come indicato in figura 74, selezionando come “*Tool Mesh*” il prisma e come “*Target Mesh*” la mesh anatomica. Il risultato sarà costituito dalla sola porzione di geometria anatomica contenuta all’interno del prisma.

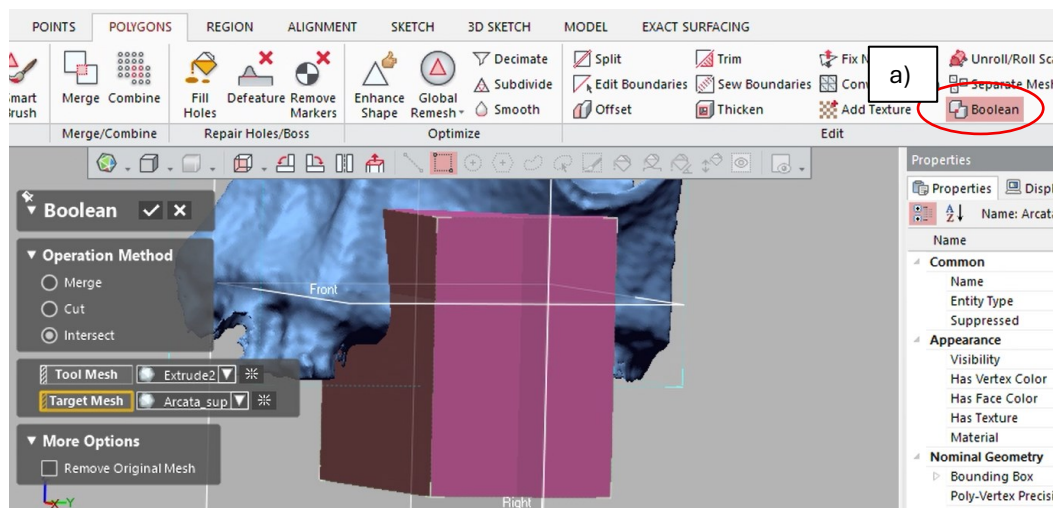


Figura 74: Boolean Intercept; Boolean (a)

La fase successiva consiste nel taglio della mesh. Per prima cosa, mediante un semplice copia e incolla (Ctrl + C; Ctrl + V), creare un duplicato della mesh appena ottenuta. Su una delle due

copie, creare uno sketch tridimensionale accedendo al modulo “3D Sketch” e selezionando “3D Mesh Sketch”, come fatto già in precedenza. Utilizzando una spline, disegnare il contorno che identifica la zona del difetto, quindi confermare lo sketch ed uscire dal modulo tramite “Exit”. La posizione della spline può essere definita dall’operatore in funzione della forma e dell’estensione della gabbia che si desidera ottenere.

Tornare al modulo “Polygons” e utilizzare il comando “Trim” (Fig.75a); selezionare la mesh come “Target” e la spline appena creata come riferimento per il taglio sotto la dicitura “Curve Options”. In questo caso, mantenere la porzione esterna alla spline e confermare l’operazione (Fig.75). Ciò che rimane è la mesh con un’apertura centrale corrispondente al difetto.

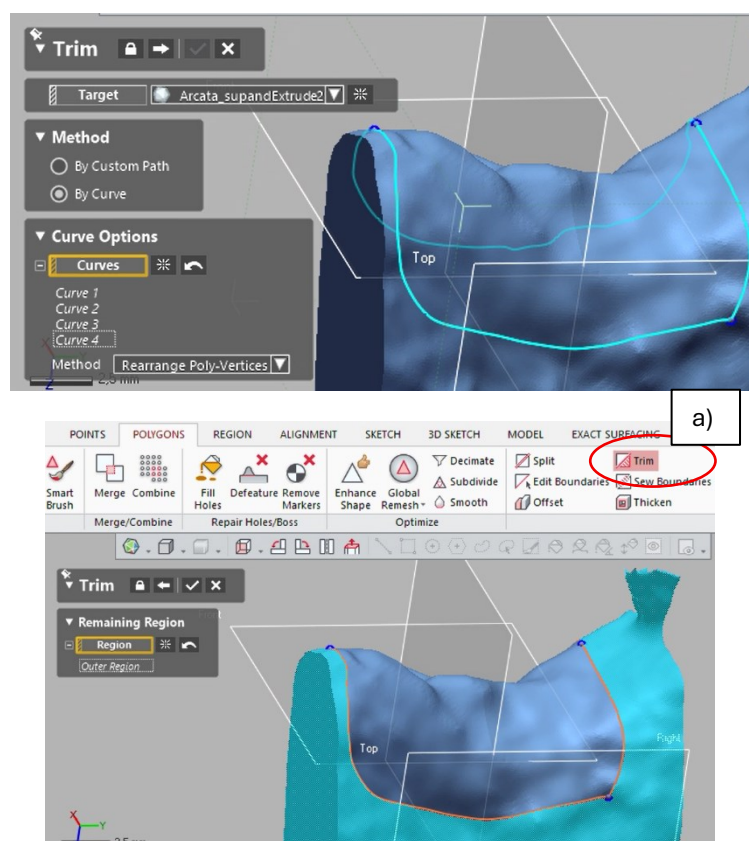


Figura 75: Trim della mesh; Trim (a)

Procedere allo stesso modo col duplicato, ma, nell’ultima operazione, tenere la parte interna corrispondente al difetto. Il risultato delle due operazioni complementari di *trim* sarà la suddivisione della mesh nelle sue componenti: l’area di perdita ossea e la zona circostante.

Avendo il modello forato, l’operazione successiva da effettuare è una chiusura del buco utilizzando la voce “Fill Holes” nel modulo “Polygons” (Fig.76). Per procedere, lasciare

invariate le impostazioni predefinite e verificare che la mesh corretta sia impostata come target. Selezionare il bordo del foro e confermare l'operazione. In questo modo l'apertura verrà chiusa mediante una superficie generata automaticamente dal software.

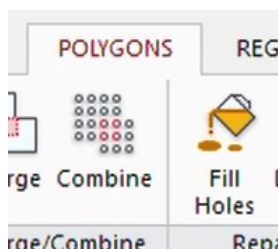


Figura 76: Fill Holes

La nuova area sostituisce temporaneamente la porzione anatomica rimossa e costituisce la base da cui verrà ricavata la struttura di appoggio della gabbia.

Applicare quindi nuovamente il comando *"Trim"*, selezionando come mesh target quella sulla quale è stato utilizzato *"Fill Holes"* e come curva di riferimento la spline creata in precedenza, identificando come porzione da mantenere la parte interna neogenerata. In questo modo verrà isolata e mantenuta la patch realizzata automaticamente per la chiusura del foro, in quanto rappresenterà la base della gabbia (Fig.77a).

Nell'albero del modello, saranno presenti le due porzioni centrali della mesh ottenute nei passaggi precedenti. Attivandole contemporaneamente, è possibile osservare una sovrapposizione tra le due geometrie (Fig. 77a), rendendo necessaria la loro unione per ottenere una mesh unica che si adatti al meglio alla fisiologia anatomica.

Pertanto, per migliorare l'accoppiamento tra mesh neogenerata e morfologia anatomica, accedere al modulo *"Polygons"* e utilizzare il comando *"Boolean"*, selezionando l'opzione *"Merge"* e le due mesh da combinare. Dopo aver confermato l'operazione, le due porzioni verranno fuse in un'unica geometria (Fig.77b). L'unione delle due componenti consente di combinare l'adattamento anatomico della porzione originale con la capacità di riempimento volumetrico della spatch generata automaticamente dal software. In conclusione, esportare la mesh in formato stl.

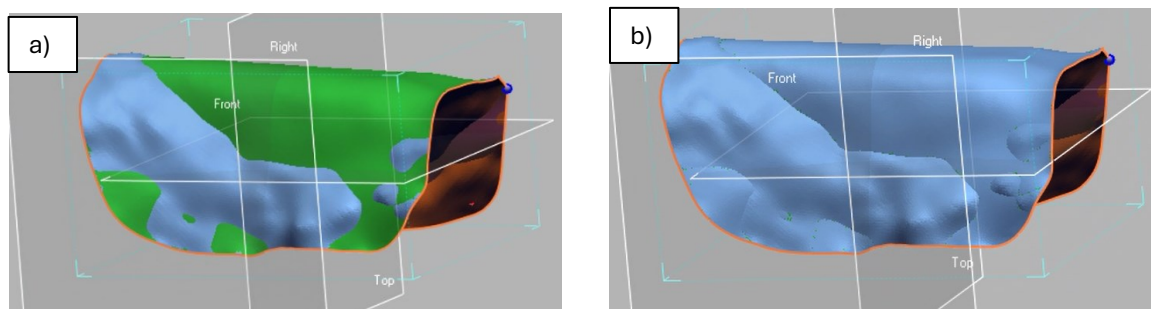


Figura 77: Le due componenti centrali sovrapposte (a); output del Boolean Merge (b)

Oltre a quanto già descritto, è possibile, qualora necessario, ricavare il volume di riempimento, ovvero il volume compreso tra la mesh appena generata e la superficie ossea anatomica. Tale volume rappresenta lo spazio destinato ad essere occupato dal materiale di riempimento.

Per ottenerlo, seguire i passaggi riportati di seguito.

- Applicare il comando *“Fill Holes”* sul bordo della mesh appena ottenuta; verrà così generato un unico volume tridimensionale chiuso.
- Eseguire un’operazione booleana di taglio tramite *“Boolean”*, *“Cut”*, impostando la mesh anatomica come tool di taglio e l’output del comando *“Fill Holes”* come target.
- Con buona probabilità, il risultato sarà costituito da numerose piccole porzioni distaccate e da poche parti di dimensioni maggiori. Accedere quindi al modulo *“Polygons”*, utilizzare il comando *“Separate Mesh”* posizionato sopra l’operazione *“Boolean”*, selezionare la mesh ed avviare il comando. In questo modo la struttura verrà suddivisa nelle sue diverse componenti.
- Nascondere dall’albero del modello le due o tre componenti di dimensioni maggiori e cancellare tutte le altre mediante una selezione multipla, ricordandosi di disattivare l’opzione *“Visible only”*.
- Le componenti rimanenti dovranno quindi essere riunite mediante il comando *“Combine”*, disponibile nella parte superiore del modulo *“Polygons”*.
- Infine, fare clic con il tasto destro sulla mesh risultante nell’albero del modello e selezionare *“Properties”* per aprire il pannello delle proprietà sulla destra dell’interfaccia. Individuare quindi il campo *“Volume”* e premere *“Calc”* per ottenere il volume del blocco risultante.

8.3. Rhinoceros 3D

Qualunque sia stato il metodo eseguito, il risultato è una mesh che descrive la base da cui verrà prodotta la gabbia finale. A partire da essa si procede con l'ultima fase di lavorazione, realizzata mediante il software *Rhinoceros 3D*, che consente la costruzione automatizzata della geometria finale. Dunque, il primo step consiste nell'aprire il file “*ProgettoGabbieVuoto.gh*”, che avvierà in automatico *Grasshopper* (Fig.78b) e *Rhinoceros 3D* (Fig.78a).

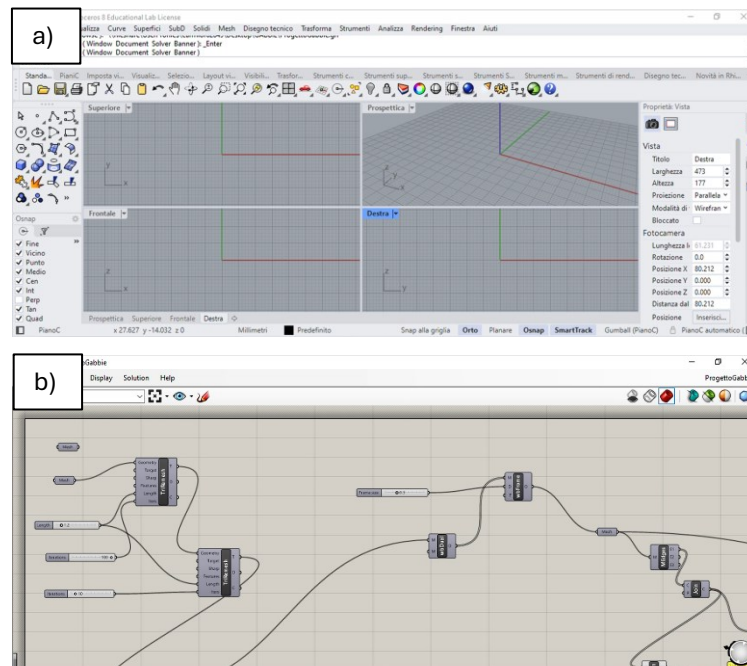


Figura 78: Rhino (a); Grasshopper (b)

Su *Rhino*, cliccare “*File*”, “*Importa*” e recuperare la mesh output in conclusione al primo o secondo metodo (7.2.1 e 7.2.2). Comparirà una finestra inerente l'unità di misura; dare la conferma dei millimetri. A questo punto si vedrà la mesh sulla scena, visualizzata interamente in nero poiché necessita di essere sottoposta a *remeshing*. Selezionarla col tasto sinistro del mouse (diventerà totalmente gialla) e accedere quindi al menu “*Mesh*”, “*Modifica Mesh*”, “*Riesegui Mesh Quad*” (Fig.79a). Si aprirà una finestra in cui è richiesto il numero di quad di destinazione, ovvero il numero di facce quadrangolari che comporranno la mesh finale. Impostare il valore a 2000, cliccare “*Elimina oggetti di input*” e confermare (Fig.79b).

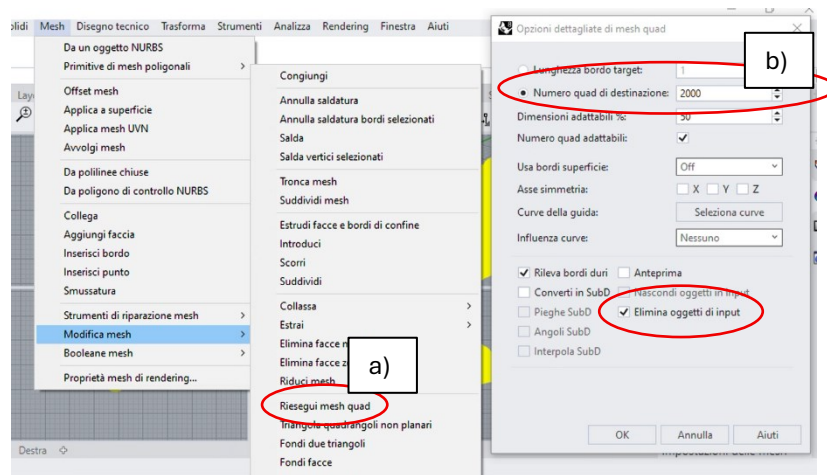


Figura 79: Quad Mesh (a); dettagli (b)

Il risultato è una mesh più uniforme e pulita, pronta per essere caricata in *Grasshopper*. Aprire quindi il software e, nell'area del workflow, in alto a sinistra (Fig.80a), fare doppio clic con il tasto sinistro per aprire la finestra di ricerca. Digitare “Mesh” e selezionare l'opzione omonima (Fig.80b) cosicché venga inserito un blocco di colore arancione (Fig.80a).

Fare clic col tasto destro sul nuovo componente e selezionare “Set One Mesh” (Fig.80c). Il software riporterà automaticamente a *Rhino*, dove sarà necessario selezionare con il tasto sinistro la mesh quadrangolare. Successivamente collegare il neocomponente (non più arancione) al blocco “TriRemesh” trascinando il collegamento con il tasto sinistro del mouse fino all'input “Geometry” (Fig.80d).

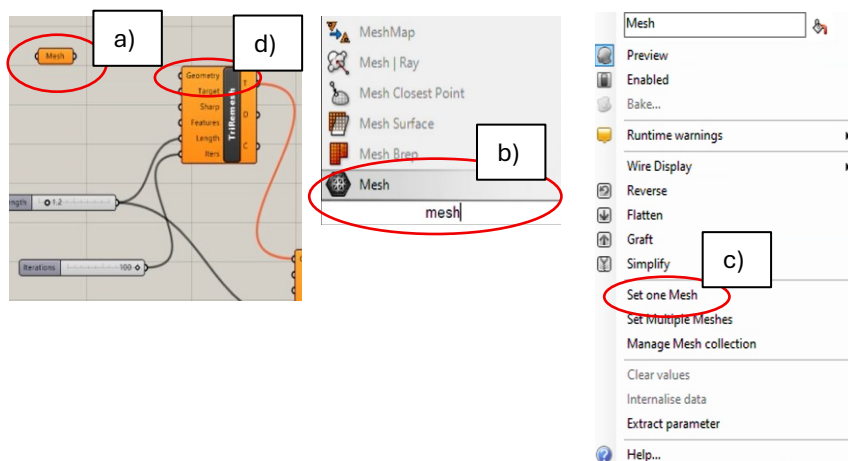


Figura 80: Inserimento della mesh su Grasshopper; blocco arancione indicante la mesh (a); dettaglio sulla finestra di ricerca (b); Set One Mesh (c); Triremesh e Geometry (d)

Una volta collegata la mesh al workflow, il software esegue automaticamente una serie di operazioni finalizzate alla generazione della gabbia finale. Tali operazioni sono descritte nel sottoparagrafo seguente.

8.3.1. Sequenza di operazioni del workflow su Grasshopper

I primi passaggi del workflow consistono in due fasi di “*Tri-remeshing*”, ossia la mesh viene riorganizzata generando una nuova triangolazione (Fig.81). In questo step, mediante gli slider legati ai blocchi, si definiscono:

- Lunghezza dei bordi della mesh triangolare (“*Length*”);
- Numero di iterazioni per ottimizzare la distribuzione degli elementi (“*Iterations*”).

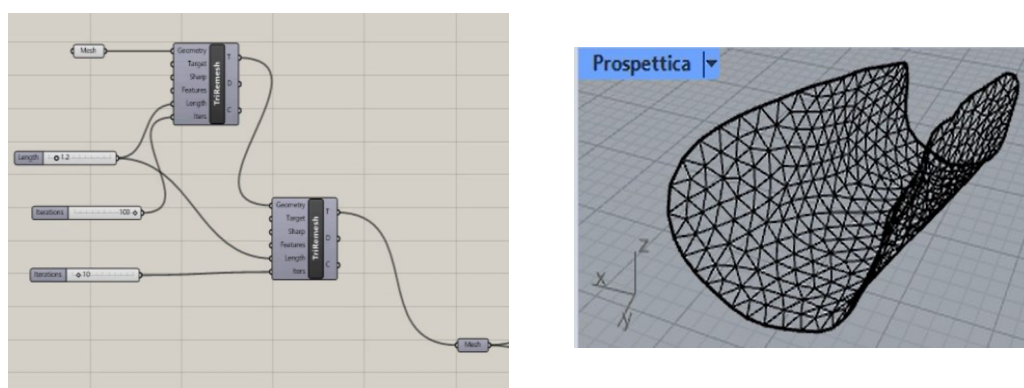


Figura 81: Tri-remeshing

Il workflow prosegue poi con “*wbDual*” (Fig.82a), comando che converte la triangolazione in una struttura poligonale duale, formata da celle poligonali regolari, adatte alla generazione del reticolo della gabbia finale. In successione, entra in gioco “*wbFrame*” (Fig.82b) che genera una struttura lungo i bordi della mesh duale, regolata dal parametro “*Frame size*” che gestisce lo spessore strutturale. Quest’ultimo parametro è di rilevata importanza perché modifica lo spessore degli elementi della texture duale e di conseguenza anche i fori che caratterizzeranno la gabbia. Il risultato di queste due operazioni è un telaio che definisce la regione interna della mesh di partenza (Fig.82c).

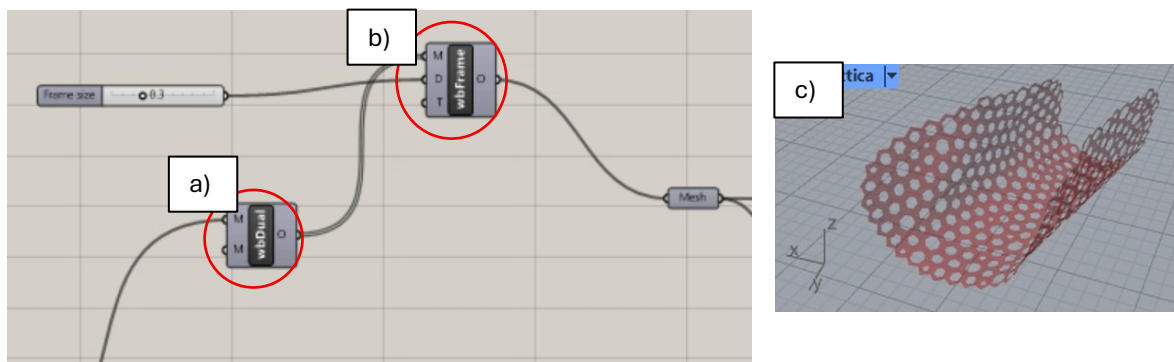


Figura 82: wbDual (a); wbFrame (b); telaio (c)

Dopo “wbFrame”, vengono estratti i bordi della struttura col comando “*Mesh Edges*” e vengono successivamente uniti con “*Join*”, ottenendo curve continue rappresentative del bordo del telaio e dei fori (Fig.83a). Tra queste, attraverso “*List Item*” (Fig.83b), viene selezionata una curva di riferimento, corrispondente nel caso in esame al bordo del telaio centrale. La curva viene quindi suddivisa nelle sue componenti mediante “*Explode*” e ne vengono identificati gli estremi tramite “*End Points*” (Fig.83c). Quanto ottengo è una serie di punti che descrivono il profilo esterno della mesh in figura 82c.

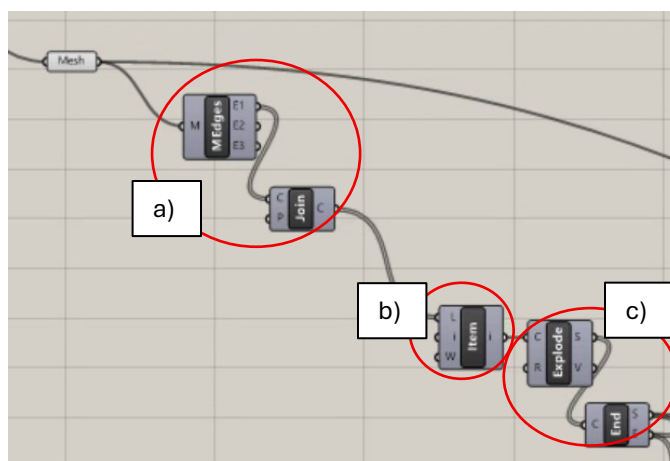


Figura 83: MeshEdges + Join (a); List Item (b); Explde + End Points (c)

La fase successiva è caratterizzata da “*Curve Closest Point*” che consente di trovare i punti più vicini ad una specifica curva (Fig.84a). Nel caso in esame, due di questi comandi sono stati impiegati assegnando a ciascuno gli estremi ricavati da “*End Points*” e una curva rappresentante il bordo della mesh di partenza, ottenuta con “*Mesh Edges*” e “*Join*” (Fig.84b).

Gli output del “*Curve Closest Point*” (Fig.84a) vengono poi gestiti dal comando “*Entwine*”, che raccoglie differenti dati e li assembla in un’unica matrice (Fig.84c). Quest’ultima viene trasposta in un secondo momento con l’operazione “*Flip*”, in modo tale da poter essere utilizzata come input di “*ConMesh*” (Fig.84d), strumento adoperato per la conversione dei punti in una mesh rappresentante il bordo più esterno della geometria iniziale triangolarizzata (Fig.85)

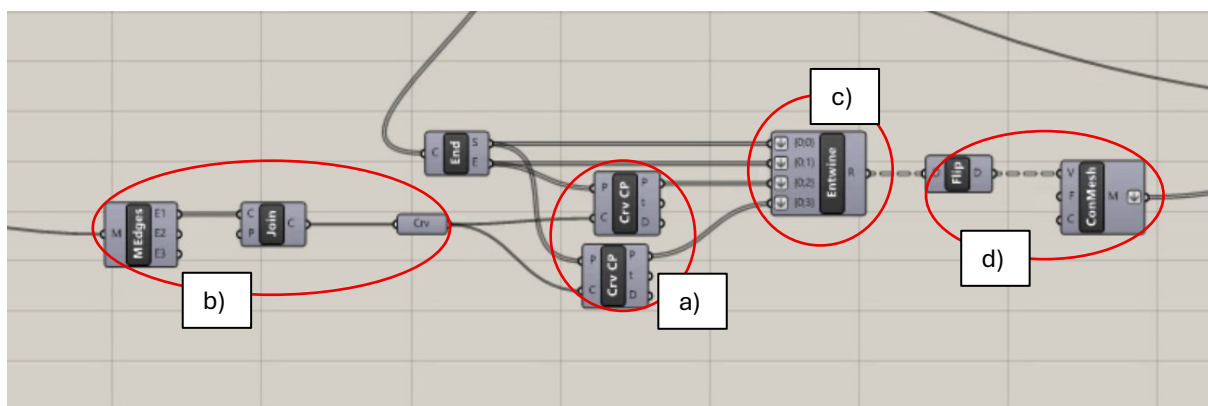


Figura 84: *Curve Closest Point* (a); *Mesh Edges + Join* (b); *Entwine* (c); *Flip + ConMesh* (d)

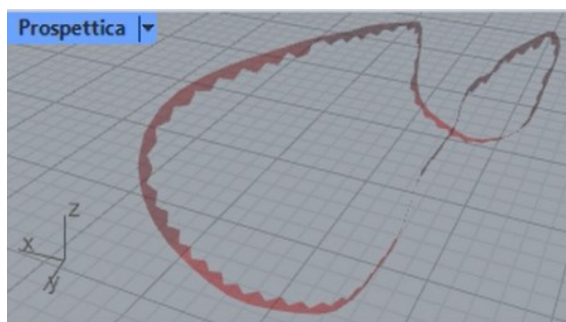


Figura 85: Mesh output del comando *ConMesh*

Terminata questa fase, si hanno due componenti complementari della struttura: la mesh che definisce la parte interna dell’input iniziale in configurazione duale (Fig.82c), e la mesh rappresentativa del confine esterno della geometria di partenza (Fig.85). Dunque, le componenti vengono combinate tramite il comando “*MeshJoin*”, ottenendo una singola mesh finale avente una texture poligonale forata (Fig.86).

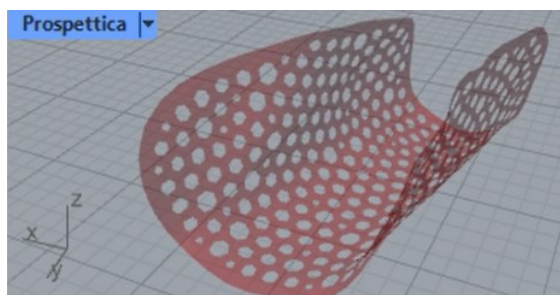


Figura 86: mesh bidimensionale ricavata dal MeshJoin

Le ultime operazioni sono finalizzate alla trasformazione del modello in una configurazione continua e regolare mediante le tre lavorazioni di seguito descritte (Fig.87a)

- “*wbThicken*” assegna uno spessore alla mesh, trasformandola in un elemento tridimensionale, in relazione ad uno spessore definito dall’utente.
- “*wbSplitQuads*” suddivide le facce quadrangolari della mesh, infittendo la suddivisione e rendendola più smooth.
- Per ultimo, “*wbCatmullClark*” che applica un arrotondamento degli spigoli vivi in relazione ad un livello impostato dall’operatore.

A seguito dell’intero workflow, il prodotto finale è una mesh tridimensionale volumetrica, contraddistinta da un reticolo poligonale forato (Fig.87b). Se il risultato non fosse visibile, premere il tasto destro sul blocco dell’ultima mesh e selezionare “*Preview*”. Tornando su Rhino sarà così visibile la gabbia generata, evidenziata in rosso.

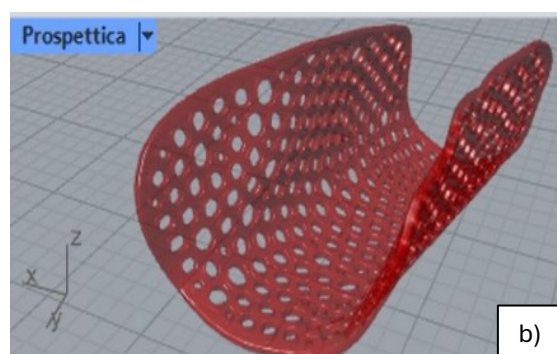
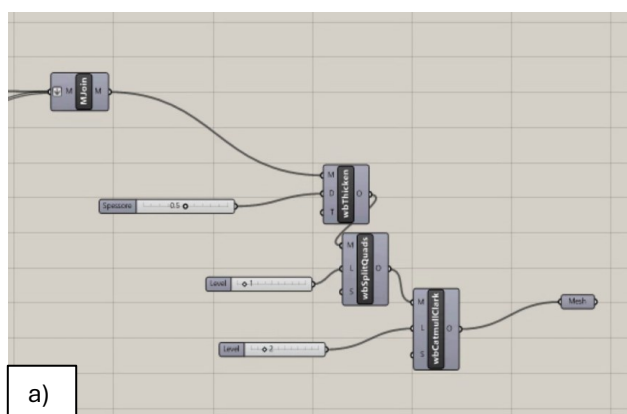


Figura 87: *wbThicken* + *wbSplitQuads* + *wbCatmullClark* (a); mesh tridimensionale conclusiva (b)

8.3.2. Fase conclusiva su Rhinoceros 3D

Terminati gli ultimi step descritti, si giunge alla fase finale della progettazione. Per prima cosa, aprire col tasto destro del mouse il menu sulla mesh iniziale del progetto di *Grasshopper* e selezionare “*Internalise Data*”. Questa operazione consente di salvare la mesh di partenza direttamente all’interno del file gh, mantenendola disponibile anche nelle successive aperture del progetto.

Successivamente, sempre col tasto destro del mouse, cliccare sul blocco dell’ultima mesh e selezionare “*Bake*”. Si aprirà una finestra di conferma alla quale è sufficiente dare l’OK. In questo modo la gabbia verrà trasferita all’interno della scena di Rhino come un nuovo modello (Fig.88).

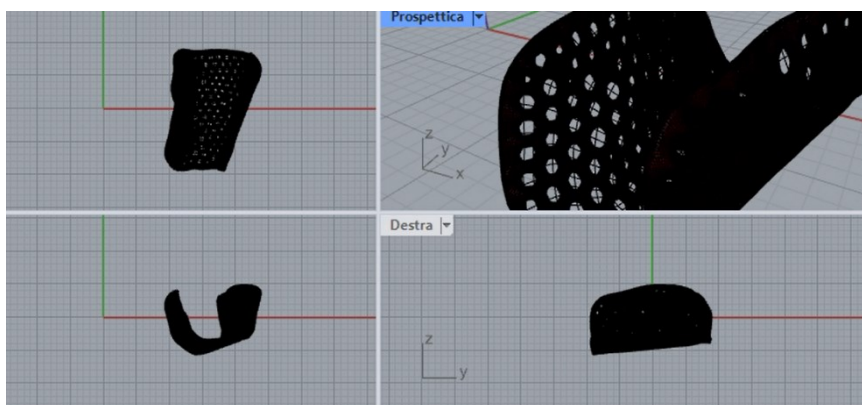


Figura 88: Mesh della gabbia dopo il comando “Bake”

Dunque, seguire i seguenti passaggi: tornare su *Rhino*, selezionare la gabbia, “*File*” in alto a sinistra, “*Esporta selezione*” e scegliere la cartella di destinazione. Durante il salvataggio, porre attenzione ad impostare il formato del file su stl e confermare le opzioni proposte nella finestra successiva per completare l’esportazione. Con questo ultimo passaggio, la gabbia è stata sviluppata e, al fine di visualizzarne il risultato finale, è possibile importarla su *Geomagic*

Design X (o *Rhino*) assieme al file anatomico. Se tutto è stato eseguito correttamente, le due componenti saranno allineate e ben visibili (Fig.89)

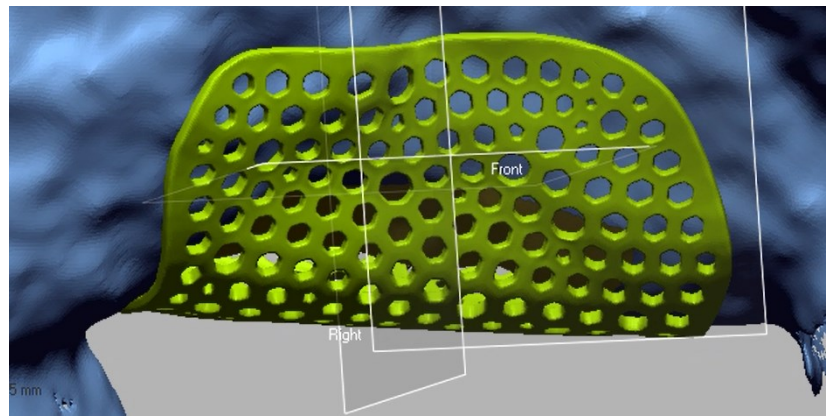


Figura 89: Risultato finale della gabbia per la rigenerazione ossea

9. BIBLIOGRAFIA

- ¹: Engel EE, Gava NF, Santos MAD, Balduino LG, Ismael LK, Modolo LFM. Updates on Bone Grafts and Substitutes. *Rev Bras Ortop* (Sao Paulo). 2025 Dec 30;60(6):s00451814114. <https://doi.org/10.1055/s-0045-1814114>. PMID: 41476619; PMCID: PMC12753175.
- ²: Sun, J., Chen, C., Zhang, B. et al. Advances in 3D-printed scaffold technologies for bone defect repair: materials, biomechanics, and clinical prospects. *BioMed Eng OnLine* 24, 51 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12938-025-01381-w>
- ³: Karkanitsa M, Fathi P, Ngo T and Sadtler K (2021) Mobilizing Endogenous Repair Through Understanding Immune Reaction With Biomaterials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:730938. doi: 10.3389/fbioe.2021.730938.
- ⁴: Zhou, L.; Miller, J.; Vezza, J.; Mayster, M.; Raffay, M.; Justice, Q.; Al Tamimi, Z.; Hansotte, G.; Sunkara, L.D.; Bernat, J. Additive Manufacturing: A Comprehensive Review. *Sensors* **2024**, 24, 2668. <https://doi.org/10.3390/s24092668>
- ⁵: Cárdenas Correa, E.F.; Torres Barahona, E.A.; Carda Castelló, J.B. Additive Manufacturing of Ceramic Materials via Direct Ink Writing (DIW): A Review. *Ceramics* 2026, 9, 16. <https://doi.org/10.3390/ceramics9020016>
- ⁶: Pagac, M.; Hajnys, J.; Ma, Q.-P.; Jancar, L.; Jansa, J.; Stefek, P.; Mesicek, J. A Review of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing. *Polymers* 2021, 13, 598. <https://doi.org/10.3390/polym13040598>
- ⁷: Mehran Dadkhah, Jean-Marc Tulliani, Abdollah Saboori, Luca Iuliano. Additive manufacturing of ceramics: Advances, challenges, and outlook. *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 43, Issue 15, 2023, Pages 6635-6664, ISSN 0955-2219. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2023.07.033>
- ⁸: Kalirajan C, Dukle A, Nathanael AJ, Oh TH, Manivasagam G. A Critical Review on Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications. *Polymers* (Basel). 2021 Sep 6;13(17):3015. <https://doi.org/10.3390/polym13173015>. PMID: 34503054; PMCID: PMC8433665.
- ⁹: Shuo Wang, Zhijun Zhao, Yongdong Yang, Antonios G Mikos, Zhiye Qiu, Tianxi Song, Fuzhai Cui, Xiumei Wang, Chunyang Zhang, A high-strength mineralized collagen bone scaffold for large-sized cranial bone defect repair in sheep, *Regenerative Biomaterials*, Volume 5, Issue 5, October 2018, Pages 283–292, <https://doi.org/10.1093/rb/rby020>

- ¹⁰: Buyuksungur, S., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2021). 3D printed hybrid bone constructs of PCL and dental pulp stem cells loaded GelMA. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(12), 2425–2437. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37235>
- ¹¹: Hou, J., Fan, D., Zhao, L., Yu, B., Su, J., Wei, J., & Shin, J. W. (2016). Degradability, cytocompatibility, and osteogenesis of porous scaffolds of nanobredigite and PCL–PEG–PCL composite. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3545–3555. <https://doi.org/10.2147/IJN.S97063>
- ¹²: CELLINK: 3D Bioprinting Leader – Bioprinters & Bioinks; <https://www.cellink.com/>
- ¹³: Lifeink 200 Collagen Bioink – CELLINK; <https://www.cellink.com/product/lifeink-200-collagen-bioink-ph-neutral/?n=1>
- ¹⁴: Alginate 5% - Viscous Hydrogel for Bioprinting & Casting – CELLINK; <https://www.cellink.com/product/alginate-5/?n=1>
- ¹⁵: Chitoink – Chitosan Hydrogel – CELLINK; <https://www.cellink.com/product/chitoink/?n=1>
- ¹⁶: Lattice MEDICAL - Lattice Medical; <https://www.lattice-medical.com/en/>
- ¹⁷: MATTISSE - Breast prosthesis - Lattice Medical; <https://www.lattice-medical.com/en/produit/mattisse/>
- ¹⁸: RODIN - Reconstructing large defects in subcutaneous tissue - Lattice Medical; <https://www.lattice-medical.com/en/produit/rodin/>
- ¹⁹: Bioresorbable polymer portfolio | Corbion; <https://www.corbion.com/products/biomedical-products/purasorb>
- ²⁰: Evonik – Leading Beyond Chemistry; <https://www.evonik.com/en.html>
- ²¹: Evonik – RESOMER bioresorbable polymers for medical devices; https://www.evonik.com/en/markets/market_1345345/resomer-bioresorbable-polymers-for-medical-devices.html
- ²²: Evonik – VESTAKEEP® PEEK; https://www.evonik.com/en/markets/market_1345345/vestakeep-peek-for-medical-devices.html
- ²³: Medical Grade 3D Printing Filaments |Shop | Lattice Services; <https://lattice-services.com/en/shop/>

- ²⁴: Oliveira RLMS, Barbosa L, Hurtado CR, et al. Bioglass-based scaffolds coated with silver nanoparticles: Synthesis, processing and antimicrobial activity. *J Biomed Mater Res.* 2020; 108: 2447–2459. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36996>
- ²⁵: Ying Jin, Hang Liu, Lei Chu, Jin Yang, Xiuyang Li, Hang Zhou, Haitao Jiang, Lei Shi, Jason Weeks, Joshua Rainbolt, Changjiang Yang, Thomas Xue, Haobo Pan, Zhongliang Deng, Chao Xie, Xu Cui, Youliang Ren. Initial therapeutic evidence of a borosilicate bioactive glass (BSG) and Fe₃O₄ magnetic nanoparticle scaffold on implant-associated *Staphylococcus aureus* bone infection. *Bioactive Materials*, Volume 40, 2024, Pages 148-167, ISSN 2452-199X, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.05.040>.
- ²⁶: Gary Fielding, Susmita Bose, SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensionally printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis in vivo. *Acta Biomaterialia*, Volume 9, Issue 11, 2013, Pages 9137-9148, ISSN 1742-7061, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.009>.
- ²⁷: Wang, J., Yang, M., Zhu, Y., Wang, L., Tomsia, A.P. and Mao, C. (2014), Phage Nanofibers Induce Vascularized Osteogenesis in 3D Printed Bone Scaffolds. *Adv. Mater.*, 26: 4961-4966. <https://doi.org/10.1002/adma.201400154>
- ²⁸: Lithoz: 3D printing for ceramics; <https://www.lithoz.com/en/>
- ²⁹: Lithoz Ceramic Materials: Hydroxy apatite 400; <https://www.lithoz.com/en/materials/lithabone-ha-400/>
- ³⁰: Lithoz Ceramic Materials: Hydroxy apatite 480; <https://www.lithoz.com/en/materials/lithabone-ha-480/>
- ³¹: Lithoz Ceramic Materials: Tricalcium phosphate: <https://www.lithoz.com/en/materials/lithabone-tcp-300/>
- ³²: CAM Bioceramics; <https://cambioceramics.com/>
- ³³: Hydroxyapatite (HA) Powders · CAM Bioceramics; <https://cambioceramics.com/product/HA--powders>
- ³⁴: β- and α -TCP Powders · CAM Bioceramics; <https://cambioceramics.com/product/%CE%B2-and-%CE%B1-TCP-Powders>
- ³⁵: HA/β -TCP Powders · CAM Bioceramics; <https://cambioceramics.com/product/Ha-%CE%B2-TCP-Powders>

- ³⁶: HA- and HA/ β -TCP Granules · CAM Bioceramics; <https://cambioceramics.com/product/ha-b-tcp-granules>
- ³⁷: Ye, J., Miao, B., Xiong, Y. et al. 3D printed porous magnesium metal scaffolds with bioactive coating for bone defect repair: enhancing angiogenesis and osteogenesis. *J Nanobiotechnol* 23, 160 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03222-3>
- ³⁸: Li, S., Yang, H., Qu, X. et al. Multiscale architecture design of 3D printed biodegradable Zn-based porous scaffolds for immunomodulatory osteogenesis. *Nat Commun* 15, 3131 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47189-5>
- ³⁹: Gracheva, A.; Polozov, I.; Popovich, A. Additive Manufacturing of Biodegradable Metallic Implants by Selective Laser Melting: Current Research Status and Application Perspectives. *Metals* **2025**, *15*, 754. <https://doi.org/10.3390/met15070754>
- ⁴⁰: Syntellix AG Products; <https://www.syntellix.de/en/products/product-overview/all.html>
- ⁴¹: Brochure-Syntellix-Magnezix; <http://www.mititalia.it/wp-content/uploads/2017/01/Brochure-Syntellix-Magnezix.pdf>
- ⁴²: Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis*. 2022 Sep;60(8-9):e23490. <https://doi.org/10.1002/dvg.23490>. Epub 2022 Jun 27. Erratum in: *Genesis*. 2026 Apr;64(2):e70049. doi: 10.1002/dvg.70049. PMID: 35757898; PMCID: PMC9786271. <https://doi.org/10.1002/dvg.70049>
- ⁴³: A Mavropoulos, S Kiliaridis, A Bresin, P Ammann. Effect of different masticatory functional and mechanical demands on the structural adaptation of the mandibular alveolar bone in young growing rats. *Bone*, Volume 35, Issue 1, 2004, Pages 191-197, ISSN 8756-3282. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.03.020>.
- ⁴⁴: Avila-Ortiz G, Chambrone L, Vignoletti F. Effect of alveolar ridge preservation interventions following tooth extraction: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2019;46(Suppl. 21):195–223. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13057>
- ⁴⁵: Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol* 2000. 2020; 84: 14–34. <https://doi.org/10.1111/prd.12331>
- ⁴⁶: Geistlich Pharma AG. Yxoss CBR – 3D Customized Titanium Mesh. <https://www.geistlich-na.com/dental-professionals/products/3d-customized-titanium-mesh/yxoss-cbr>

- ⁴⁷: BTK – the smile system. 3D titanium mesh <https://www.btk.dental/soluzioni-digitali/3d-mesh/>
- ⁴⁸: Mardling, Paul and Alderson, Andrew and Jordan-Mahy, Nicola and Le Maitre, Christine Lyn; The use of auxetic materials in tissue engineering; *Biomater. Sci.*; 2020; 8; 8; 2074-2083; The Royal Society of Chemistry; <http://dx.doi.org/10.1039/C9BM01928F>
- ⁴⁹: Kim, Y.; Son, K.H.; Lee, J.W. Auxetic Structures for Tissue Engineering Scaffolds and Biomedical Devices. *Materials* **2021**, *14*, 6821. <https://doi.org/10.3390/ma14226821>
- ⁵⁰: Tang, A.; Ji, J.; Li, J.; Liu, W.; Wang, J.; Sun, Q.; Li, Q. Nanocellulose/PEGDA Aerogels with Tunable Poisson's Ratio Fabricated by Stereolithography for Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Culture. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 603. <https://doi.org/10.3390/nano11030603>
- ⁵¹: Xuezheng Geng, Yan Yao, Huiwen Huang, Qiao Li, Lizhen Wang, Yubo Fan; Mechanical and biological characteristics of 3D-printed auxetic structure in bone tissue engineering; *Journal of Biomechanics*; Volume 184,2025; 112685; ISSN 0021-9290; <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2025.112685>
- ⁵²: Ivanovski S, Staples R, Arora H, Vaquette C, Alayan J. Alveolar bone regeneration using a 3D-printed patient-specific resorbable scaffold for dental implant placement: A case report. *Clin Oral Implants Res.* 2024 Dec;35(12):1655-1668. <https://doi.org/10.1111/clr.14340>
- ⁵³: Ioannis Pantazos, Afroditi Kapourani, Alexandros Chortis, Christos Cholevas, Styliani Verykokou, Charalabos Ioannidis, Konstantinos Katakalos, Panagiotis Barmpalexis. Personalized drug-loaded 3D-printed scaffolds for periodontal bone repair: Structural, mechanical, and controlled release properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 114, Issue 7, 2025, 103807, ISSN 0022-3549, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2025.103807>.
- ⁵⁴: Murphy, K. P. (2012). *Machine Learning: A Probabilistic Perspective*. Cambridge, MA: MIT Press
- ⁵⁵: Nathaniel W. Yang. Mon, 30 Nov 2020 in *Philippine Journal Of Otolaryngology-Head And Neck Surgery* On the Importance of Proper Window and Level Settings in Temporal Bone CT Imaging. DOI: 10.32412/pjohns.v35i2.1523
- ⁵⁶: Main literary findings on autogenous and xenogenous grafting: A review. Daiane Balero Galindo¹, Daniel Nunes Spezamiglio¹, Taylane Soffener Berlanga de Araújo¹, Patrícia Garani Fernandes^{1,2}, Leandro Moreira. Tempest^{1,2}, Idiberto José Zotarelli Filho^{2*} and Marcelo

Augusto Rudnik Gomes^{1,2}. University Center North Paulista (Unorp) - São José do Rio Preto – SP, Brazil. Post Graduate and Continuing Education (Unipos), Street Ipiranga, 3460, São José do Rio Preto SP, Brazil. DOI: 10.15761/DOCR.1000246

⁵⁷: Pabst, A., Becker, P., Götz, W. et al. A comparative analysis of particulate bovine bone substitutes for oral regeneration: a narrative review. *Int J Implant Dent* 10, 26 (2024). <https://doi.org/10.1186/s40729-024-00544-z>

⁵⁸: Guarnieri R, Belleggia F, DeVillier P, Testarelli L. Histologic and Histomorphometric Analysis of Bone Regeneration with Bovine Grafting Material after 24 Months of Healing. A Case Report. *J Funct Biomater*. 2018 Aug 8;9(3):48. doi: 10.3390/jfb9030048. PMID: 30096773; PMCID: PMC6163257.

⁵⁹: Olate, Sergio and Netto, Henrique and Klüppel, Leandro and Vásquez, Bélgica and Chaves, Maria and Sol, Mariano, 2013, 12, 1257-1262. Comparison of Bone Graft Healing Between Autogenous Bone, Blood Clot and Anorganic Bovine Bone Matrix. Radiographic and Histological Analyses, 31, *International Journal of Morphology*; DOI: 10.4067/S0717-95022013000400018

10. RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Professor Gianpaolo Savio per la disponibilità, il tempo dedicatomi, la guida e il supporto forniti durante lo sviluppo di questo lavoro di tesi. La sua esperienza, la cordialità, la gentilezza e i preziosi consigli sono stati fondamentali per la realizzazione del progetto.

Ringrazio la mia famiglia per il sostegno costante, per i sacrifici affrontati nel corso degli anni e per aver creduto in me, anche nei momenti più complessi del mio percorso universitario. Senza il loro supporto, umano e morale, il raggiungimento di questo traguardo non sarebbe stato possibile.

Un grazie speciale ai miei amici, per la loro presenza nei momenti in cui ne avevo bisogno, nei momenti di solitudine e in quelli in cui sentivo il bisogno di avere accanto qualcuno con cui parlare, confrontarmi e da cui ricevere consigli per andare avanti. Grazie per aver condiviso con me non solo i momenti più belli, ma anche quelli più difficili, rendendo questo percorso più leggero e meno pesante da affrontare.

Ringrazio tutti i compagni di università che ho incontrato lungo il mio percorso magistrale e triennale, con cui ho condiviso studio, ansie, soddisfazioni, festeggiamenti e traguardi che hanno segnato profondamente questi anni, rendendo questo percorso universitario più attivo ed emozionante.

Ringrazio i miei coinquilini che ho avuto qui a Padova, persone di buon cuore che mi hanno fatto emozionare e visto nei momenti di luce e di buio, chi di più e chi di meno. Ringrazio chi tra questi mi ha ascoltato e capito più di tutti, aiutato, dato dei consigli e spronato. Probabilmente il tempo passato a Padova sarebbe stato di gran lunga peggiore senza voi.

Un pensiero va anche ai miei colleghi del Conad, con cui ho condiviso momenti di crescita personale e lavorativa, contribuendo, ciascuno a modo proprio, a rendere più significativo questo periodo della mia vita. Ho avuto occasione di rendermi conto di essermi spesso sottovalutato per quello che sono grazie ai momenti in cui nemmeno io mi sarei riposto della fiducia, ma voi l'avete fatto.

Desidero inoltre ringraziare tutte le persone che, nel corso di questi anni, hanno riposto fiducia in me, credendo nelle mie capacità anche nei momenti di difficoltà. Un pensiero speciale va a chi ha saputo vedermi per ciò che sono davvero, incoraggiandomi a dare sempre il massimo e accompagnandomi con sincerità, stima e affetto lungo questo percorso. Inoltre, ringrazio coloro che hanno saputo dirmi le cose come stavano, che mi hanno sostenuto sbattendomi in faccia la

realità, perché le belle parole di conforto le sanno dire tutti, chi si differenzia davvero è chi ti dice le cose come stanno, anche dicendoti brutte parole, ma con lo scopo di farti capire che la vita è difficile.

In opposizione, ringrazio coloro che invece mi hanno remato contro, mi hanno detto che non ce l'avrei fatta nella vita, che sono un fallito, che mi hanno usato e buttato via come una Maserati da demolire. Loro sono le persone che più di tutte mi hanno allevato, cresciuto e abituato alla vita. Grazie per avermi fatto capire che nella vita non devi mai essere il numero due, ma solo e soltanto il numero Uno. Chi compete solo per il gusto di gareggiare ha già perso in partenza.

Per ultimo ho tenuto il ringraziamento più sincero e speciale di questi anni. Vorrei ringraziare con tutto il cuore i componenti del gruppo Hardstyle Italia perché la vostra passione è il mio stesso *Fire* che arde nella *Our church*. Vi ringrazio perché i momenti passati con voi ai festival ed eventi sono i momenti più incredibilmente spensierati di tutta la mia vita, momenti di gioia, lacrime, divertimento, e preoccupazioni. Non foste entrati nella mia vita, sarei stato *Forever lost*. Ogni evento, situazione, festival e ricordo passato e futuro li porterò con me per sempre. Grazie per farmi sentire parte di una grande famiglia.

E se l'amore finisse?
E se cambiasse forma?
E se la paura vincesse?
E se la usassi come forza?
Tutto si ferma,
Tutto sta iniziando,
Era dolore,
Ora è forza.

E se avessi bisogno di silenzio?
E se un abbraccio fosse la tua voce?
Era un silenzio pesante,
Ora è un silenzio pieno.

Era la fine di un capitolo,
ma non del libro.