

A Microtomografia computadorizada aplicada à bioengenharia tecidual óssea com o uso de biomateriais

The X-ray microcomputed tomography applied to bioengineering bone tissue with the use of biomaterials

Anderson Cunha dos Santos¹, Carlos Maurício Cardeal Mendes² e Fabiana Paim Rosa³

¹Tecnólogo em Radiologia. Mestrando do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, ICS – UFBA

²Médico Pesquisador. Professor do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, ICS – UFBA

³Professora Adjunto. Departamento de Biointeração. Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, ICS – UFBA

Resumo

Objetivo: Contextualizar o uso da microtomografia computadorizada (μ TC) aplicada à bioengenharia tecidual óssea com o uso de biomateriais, com o foco em suas vantagens, limitações e aplicações em arcabouços, por meio de uma revisão de literatura.

Metodologia: Foram selecionados artigos originais e de revisão publicados entre 2006 e 2013, em duas bases de dados bibliográficas - Literatura Internacional em Ciências da Saúde (PubMed) e Portal Periódicos CAPES. **Resultados:** Dos vinte e seis (26) artigos selecionados na busca, foram utilizados dezenove (19), para a escrita dessa revisão. **Conclusão:** O presente artigo é apenas prelúdio para o desenvolvimento de novas pesquisas sobre a μ TC e visa o aprofundamento do conhecimento das aplicabilidades da mesma, no campo da bioengenharia tecidual óssea com o uso de biomateriais.

Palavras Chave: Microtomografia por raio-X. Engenharia tecidual. Bioengenharia.

Abstract

Objective: Contextualize the use of computed microtomography (μ TC) applied bioengineering bone tissue with the use of biomaterials, with the focus on advantages, limitations and applications on scaffolds through a literature review. **Methodology:** We selected original articles and review published between 2006 and 2013, in two bibliographic databases-International Literature in Health Sciences (PubMed) and CAPES Journal Portal. **Results:** Twenty-six (26) articles were selected from databases researching and nineteen (19), were included in this review. **Conclusion:** The present article is only a prelude to the development of new research on μ TC, aiming at deepening the knowledge of the applications of the same, in the field of bioengineering bone tissue with the use of biomaterials.

Keywords: X-Ray microtomography. Tissue engineering. Bioengineering.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de microtomografia computadorizada (μ TC) têm estado disponíveis comercialmente há mais de duas décadas. Semelhante, em princípio, à tomografia computadorizada médica, o funcionamento da μ TC se dá através da captação de dados adquiridos em diversos ângulos de visualização, a partir da atenuação de raios-X, para reconstruir em três dimensões (3D) uma imagem da amostra a ser analisada (BOUXSEIN et al., 2010). As amostras normalmente variam de poucos milímetros a alguns centímetros de tamanho, com resoluções na faixa de micron (DAVIS; EVERSLED; MILLS, 2013).

A μ TC pode ser classificada quanto a fonte de raios-X em dois tipos: Radiação Síncrotron (SR) e μ TC de

laboratório com Micro/Nano foco de raios-X (YUE et al., 2010). A radiação síncrotron é gerada a partir de um anel de armazenamento de elétrons e pode ser monocromática, tendo um comprimento de onda específico. Portanto, diferentes elementos podem ser distinguidos de acordo com seu número atômico (YUE et al., 2010; ZEBBE et al., 2010).

A engenharia tecidual tem emergido como uma abordagem promissora no reparo e regeneração de tecidos e órgãos perdidos, danificados ou, em geral, funcionalmente comprometidos, em consequência de traumas, lesões, doenças ou envelhecimento (ZAMBUZZI et al., 2010; GIULIANI et al., 2013). Este campo de pesquisa relativamente recente, integra diversas áreas do conhecimento, como a ciência dos materiais, as engenharias e a biologia com o objetivo de desenvolver e/ou aperfeiçoar as técnicas e os biomateriais que contribuam com o

Correspondência / Correspondence: Anderson Cunha dos Santos Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N. Vale do Canela. Sala 400. Salvador-BA, Brasil. Telefone: +55 71 88322397

restabelecimento da função (BOER; BLITTERSWIJK; LÖWIK, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

Estes biomateriais são definidos como qualquer substância, natural ou sintética, que abrange o todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, que complementa ou substitui uma função natural (MAIA et al., 2010). Alguns destes materiais são de fácil dissolução e absorção, o que, concomitantemente, possibilitam e estimulam a formação óssea (OLIVEIRA et al., 2010).

Dentre as estratégias empregadas pelos pesquisadores desta área, pode-se destacar o uso de fatores de crescimento, células e *scaffolds* (arcabouços) (APPEL et al., 2012). Estes últimos são biomateriais que apresentam, geralmente, estrutura porosa, concebidas de acordo com a geometria da perda tecidual ou em formatos que possibilitem preencher a área lesionada, para facilitar a síntese de nova matriz extracelular (MEC) com o objetivo de restaurar a função perdida (GULDBERG et al., 2008). Assim, desempenham um papel crítico em termos de apoio bioquímico e mecânico para o comportamento celular e reparo tecidual (APPEL et al., 2012).

A utilização destes biomateriais na regeneração do tecido ósseo, como uma opção aos enxertos ósseos, é vantajosa por não lesionar tecidos saudáveis, reduzir os riscos de contaminações, virais e bacterianas, além de serem disponíveis comercialmente (OLIVEIRA et al., 2010).

As tecnologias de imagens 3D mais utilizadas na bioengenharia tecidual e na medicina regenerativa, para a avaliação do reparo tecidual ou substituição de tecidos ou órgãos, são: ultrassom, microscopia fotoacústica, ressonância magnética, imagens obtidas a partir de equipamentos ópticos, cintilógrafos, raios-X, sendo a μ TC a promissora na engenharia tecidual óssea (APPEL et al., 2013).

Tendo em vista o avanço das pesquisas na área bioengenharia tecidual óssea com o uso de biomateriais e seu impacto na medicina regenerativa e as características da μ TC e sua aplicação neste campo, faz-se necessário contextualizar o uso da μ TC aplicada à bioengenharia tecidual óssea, com o foco em suas vantagens, limitações e aplicações em arcabouços, de uma revisão de literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

As buscas foram realizadas em duas bases de dados bibliográficas - Literatura Internacional em Ciências da Saúde (PubMed) e Portal Periódicos CAPES. Ao finalizar as pesquisas em cada base, as referências duplicadas foram excluídas. Foram selecionados artigos originais e de revisão publicados entre 2006 e 2013, escritos em inglês e português, com os descritores: “microtomografia de raios-X”, “engenharia de tecidos”, “engenharia do tecido ósseo” e excluídos os artigos que não trazem informações relevantes ao tema ou publicados em anos anteriores a 2008.

RESULTADOS

Foram localizados 44 artigos dos quais 18 foram excluídos. Após a avaliação do texto completo dos 26 artigos selecionados, 19 artigos foram incluídos, 7 foram excluídos. Os principais temas abordados dos 19 artigos selecionados foram: “ μ TC aplicada bioengenharia tecidual” (9), “biomateriais” (1), “ μ TC aplicada a scaffolds” (3), “ μ TC de radiação Synchrotron” (3), “ μ TC com Raios - X contraste de fase” (2) e “outras aplicações de μ TC” (1).

DISCUSSÃO

O uso de técnicas de imagem que utiliza raios-X é amplamente aplicado em estudos in vivos que avaliam o tecido ósseo, com a utilização de diferentes tipos de biomateriais e em modelos animais. Algumas técnicas que empregam a μ TC permitem a segmentação de arcabouços, osso velho e tecido ósseo recém-formado, enquanto outras técnicas, com o uso da mesma ferramenta, só caracteriza o osso recém-formado. Para análise de amostras ex vivo, a mesma só é aplicada ao estudo de osteointegração e de implantes ósseos (APPEL et al., 2013).

A μ TC de alta resolução é a escolha mais razoável como recurso não destrutivo para a análise da morfologia óssea, comparado com as técnicas convencionais (SALES et al., 2011). Esta técnica é aplicada em pesquisas que envolvem a reparo ósseo, de pequenos e grandes animais, bem como humanos (KASSECK et al., 2010). A μ TC que utiliza raios-X convencionais pode alcançar uma resolução de imagem no valor de $10\mu\text{m}$, todavia, se a radiação utilizada for síncrotron a resolução é, aproximadamente, de $1\mu\text{m}$. Como é sabido, este método possibilita a separação de suas estruturas 3D para obter dados quantitativos, tais como volume, espessura, crescimento, destruição, remodelação e alterações na densidade do tecido ósseo. Sabendo, também, que imagens com voxel (o equivalente de pixels em 2D) de tamanhos inferiores a $10\mu\text{m}$ são alcançados com facilidade pela μ TC, esta técnica de imagem é superior a outras, tais como ultrassom e ressonância magnética, que alcançam $30\mu\text{m}$ e $100\mu\text{m}$, respectivamente (BARBETTA et al., 2012).

No entanto, a ferramenta da μ TC não demonstra ser útil para a imagem latente direta dos tecidos moles devido à baixa absorção de raios-X em tecidos não mineralizados. Para compensar a baixa radiopacidade dos tecidos moles, é desenvolvida uma técnica com contraste em que as amostras são equilibradas numa solução contendo um agente iônico de tomografia computadorizada (CT) (PALMER; GULDBERG; EVENSTON, 2006) que amplia o limite de formação de imagem de estruturas tais como cartilagem e vasos sanguíneos. Junto à morfologia detalhada em 3D, as atenuações do voxel fornecem outro nível de informação sobre o tipo ou a densidade tecidual local (GULDBERG et al., 2008).

Nos estudos de análise de reparo tecidual, principalmente, com o uso de biomateriais, o método mais comum para é a microscopia óptica. Todavia, as etapas do preparo histológico causam perdas teciduais devido às substâncias químicas utilizadas, são demoradas e semiquantitativas, embora o interior dos arca-bouços seja visualizado. A microscopia de fluorescência pode ser quantitativa quando são aplicadas abordagens de alto rendimento e a microscopia confocal pode produzir imagens em 3D. Contudo, não é possível visualizar através de materiais opacos a imagem do interior de um arca-bouço (DORSEY; LIN-GIBSON; SIMON, 2009).

No tocante aos scaffolds analisados em uma imagem de μ TC, os parâmetros são: o tamanho dos poros, diâmetro de interconexão dos poros e medida de interconectividade, definida como o número de ligações, ao longo de certo diâmetro, por poro (JONES et al., 2009). Este método de análise possui a vantagem de gerar imagens tridimensionais e penetrar em profundidade no interior de arca-bouços com a primazia de ser um método quantitativo e não destrutivo (DORSEY; LIN-GIBSON; SIMON, 2009). Ademais, a μ TC pode ser utilizada para prever as propriedades mecânicas dos materiais e os efeitos da arquitetura dos poros individuais dos arca-bouços se o correspondente possuir as propriedades de um material já conhecido (JONES et al., 2009). Assim, é uma ferramenta versátil aplicada à bioengenharia tecidual óssea com o uso de biomateriais.

Appel, Anastasio, Brey (2011), demonstraram em seu trabalho que as técnicas que utilizam X-Ray Phase Contrast (X-ray PC) possibilitam a visualização de tecidos moles, biomateriais e estrutura de tecidos mineralizados, com excelente resolução espacial, dispensando o uso de contraste, com a superação de algumas limitações da μ TC convencional.

O estudo de Appel e outros (2012) ratificam o potencial da tecnologia de X-ray PC e destaca a visualização de arca-bouços de poliéster e tecido moles (com pouca absorção de raios-X) dentro do implante de tecido ósseo, o que não era possível com o μ TC convencional. Em seu estudo com imagens *ex vivo*, com o uso de X-ray PC foi possível identificar o tecido ósseo recém formado dentro do crânio de ratos, bem como o arca-bouço residual do polímero Poli (L-ácido láctico) (PLLA). Assim, pode-se notar que é possível detectar a segmentação das lesões tanto em tecidos ósseos e moles quanto em biomateriais poliméricos.

A partir deste resultado é sugerida, como perspectiva futura, que esta técnica pode ter uma importante aplicação para a engenharia tecidual óssea com o uso de biomateriais na análise da quantificação do tecido ósseo a ser formado, simultaneamente, à avaliação da degradação do arca-bouço. Contudo, esta nova tecnologia ainda precisa ser pesquisada e aprimorada, sobretudo quanto a redução do tempo de aquisição de dados e a possibilidade de desenvolver pesquisas em amostras *in vivo* (APPELL; ANASTASIO; BREY, 2011; APPEL et al., 2012; APPEL et al., 2013).

CONCLUSÃO

Este artigo sugere que o desenvolvimento da bioengenharia tecidual óssea como o uso de biomateriais está muito relacionado à μ TC em virtude de ser uma ferramenta não invasiva e polivalente na análise tecidual. O presente estudo é apenas prelúdio para o desenvolvimento de novas pesquisas sobre a μ TC e visa o aprofundamento do conhecimento das aplicabilidades da mesma, no campo da bioengenharia tecidual óssea. Não obstante, se faz necessário o estudo mais intenso sobre a μ TC de radiação síncrona e μ TC com X-ray PC, pouco relatado na literatura levantada.

REFERÊNCIAS

- APPEL, A.A. et al. Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v.34, n.28, p.6615–6630, 2013.
- APPEL, A.A. et al. Imaging of poly (a-hydroxy-ester) scaffolds with X-ray phase-contrast microcomputed tomography. **Tissue Eng. Part C Methods**, New Rochelle, v.18, n.11, p.859–865, 2012.
- APPEL, A.A.; ANASTASIO, M.A.; BREY, E.M. Potential for imaging engineered tissues with X-Ray phase contrast. **Tissue Eng. Part. B Rev.**, New Rochelle, v.17, n.5, p.321–330, 2011.
- BARBETTA, et al. Role of X-ray microtomography in tissue engineering. **Ann. Ist. Super Sanità**, Roma, v.48, n.1, p.10–18, 2012.
- BOER, J.; BLITTERSWIJK, C.; LÖWIK, C. Bioluminescent imaging: emerging technology for non-invasive imaging of bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 9, p. 851–1858, 2006.
- BOUXSEIN, M.L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.
- DAVIS, G.R.; EVERSHED, A.N.; MILLS, D. Quantitative high contrast X-ray microtomography for dental research. **J. Dent.**, Bristol, v.41, n.5, p. 475–482, 2013.
- DORSEY, S.M.; LIN-GIBSON, S.; SIMON, C.G. X-ray microcomputed tomography for the measurement of cell adhesion and proliferation in polymer scaffolds. **Biomaterials**, Guildford, v.30, n.16, p.2967–2974, 2009.
- GIULIANI, A. et al. In vivo regenerative properties of coralline-derived (Biocoral) scaffold grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation X-Ray microtomography. **Clin. Implant. Dent.Relat. Res.**, Hamilton, 25 Jan., 2013.
- GULDBERG, R.E. et al. 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. **Biomaterials**, Guildford, v. 29, n. 28, p.3757–3761, 2008.
- JONES, J.R. et al. Quantifying the 3D macrostructure of tissue scaffolds. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, London, v. 20, n. 2, p. 463–471, 2009.
- KASSECK, C. et al. Comparison of optical coherence tomography, microcomputed tomography, and histology at a three-dimensionally imaged trabecular bone sample. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v.15, n.4, p. 046019-1 - 046019-6, 2010.
- MAIA, M. et al. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 566–572, 2010.
- OLIVEIRA, L.S.A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Rev. Ciênc. Méd.**

Biol., Salvador, v. 9, Supl.1, p. 37-44, 2010.

PALMER, A.W.; GULDBERG, R.E.; LEVENSTON, M.E. Analysis of cartilage matrix fixed charge density and three-dimensional morphology via contrast-enhanced microcomputed tomography. **Proc.Nat.Acad.Sci.**, Atlanta, v.103, n. 51, p.19255–19260, 2006.

SALES, E. et al. Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence. **Appl. Radiat. Isot.**, Oxford, v.70, n.7, p.1272–1276, 2011.

YUE, S. et al. Synchrotron x-ray microtomography for assessment of bone tissue scaffolds. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, London, v.21, n.3, p.847–853, 2010.

ZAMBUZZI, W.F. et al. Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 315-321, 2010.

ZEHBE, R. et al. Going beyond histology. Synchrotron micro-computed tomography as a methodology for biological tissue characterization: from tissue morphology to individual cells. **J. R. Soc. Interface**, London, v. 7, n. 42, p. 49–59, 2010.

Submetido em 13.11.2013;

Aceito em 20.12.2013.