

A microtomografia computadorizada como ferramenta de caracterização de arcabouços para engenharia tecidual

Renata Moreira da Costa
Faculdade de Engenharia Elétrica
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, Brazil
ORCID: 0000-0003-4710-7553

Márcia Mayumi Simbara
Faculdade de Engenharia Elétrica
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, Brazil
ORCID: 0000-0003-2249-0488

Abstract — A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar voltado para desenvolvimento de estruturas biológicas que restaurem, mantenham ou melhorem funções teciduais. Dentre os componentes necessários para isso, há os arcabouços tridimensionais, estruturas criadas para suporte inicial das células e consequente formação de um tecido. Para avaliação do desempenho do arcabouço, é importante analisar características microestruturais como a porosidade, a interconectividade e o tamanho dos poros. Algumas técnicas como a microscopia eletrônica de varredura (MEV), picnometria e porosimetria de mercúrio, já vem sendo usadas para caracterizar os arcabouços. Todavia, alguns estudos mostraram a microtomografia computadorizada como padrão ouro para extrair informações detalhadas sem danificar a amostra em estudo. A Microtomografia Computadorizada de Raios X (microCT) é uma técnica não invasiva e apresenta uma alta resolução, contribuindo para análise e visualização tridimensional interna de vários tipos de amostras. Devido a essas vantagens, diversos pesquisadores vem estudando a microCT como técnica para caracterização de arcabouços para engenharia tecidual, visando obter informações mais apuradas a respeito da porosidade dessas estruturas, que irão influenciar diversos fatores como o desempenho biológico e as propriedades mecânicas das mesmas. O objetivo do trabalho consiste em apresentar a microCT como ferramenta de caracterização de arcabouços para engenharia tecidual e compará-la com outras técnicas utilizadas atualmente. Verificou-se que a microCT vem sendo utilizada na área para análises qualitativas e quantitativas, principalmente por conseguir visualizar poros cegos e área da seção transversal, sem utilizar elementos tóxicos ou sem destruir a amostra. Existem algumas desvantagens, que seriam pouca capacidade de absorção de raios-x em amostras de baixa densidade radiográfica. No entanto, apesar do crescente interesse em utilizar essa técnica, é possível perceber que muitos pesquisadores não a dominam por não ter relatórios com detalhes importantes sobre vários parâmetros da microestrutura e da utilização correta da microCT. Concluiu-se que a caracterização de arcabouços por microtomografia computadorizada é uma área que ainda está em desenvolvimento e com acesso limitado, porém vem ganhando destaque e tende a se tornar mais procurada e usada entre os pesquisadores para aplicação na engenharia tecidual.

Palavras-chave — engenharia tecidual, arcabouços, microCT, porosidade.

I. INTRODUÇÃO

Segundo Langer e Vacanti, a engenharia tecidual pode ser definida como um “campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia e das ciências biológicas para desenvolvimento de estruturas biológicas que restaurem, mantêm ou melhore funções teciduais” [1]. A engenharia tecidual tem como característica a utilização de uma tríade composta por arcabouços tridimensionais, células e sinais/estímulos.

Os arcabouços são usados como matrizes extracelular artificiais, que fornecem um suporte inicial para as células. Eles podem ser fabricados a partir de materiais bioabsorvíveis, pois devem se degradar à medida que o novo tecido é formado, e tais materiais podem ser polímeros, cerâmicas, metais ou compósitos. Na escolha do material e da técnica utilizada para fabricar um arcabouço para uma determinada aplicação, é preciso levantar características mecânicas, químicas e morfológicas desejadas.

Um dos principais requisitos morfológicos, comum a todas as aplicações, é a porosidade, visto que a transferência de nutrientes e oxigênio, a remoção de resíduos pelas células e próprio crescimento tecidual ocorrem por entre os poros. Idealmente, esses poros devem ser interconectados, para permitir o crescimento tridimensional do tecido e sua vascularização. Além disso, o tamanho adequado e uma grande área superficial costumam favorecer a adesão e proliferação das células.

Para o estudo da porosidade de um arcabouço, o ideal é utilizar equipamentos e técnicas que consigam extrair o máximo de informações sobre a morfologia, sem danificar ou alterar a amostra. Dentre as técnicas utilizadas, as mais comuns são a microscopia eletrônica de varredura (MEV), porosimetria de mercúrio, picnometria e a microtomografia computadorizada de raios-X.

Apesar de existirem várias técnicas disponíveis, a caracterização de arcabouços poliméricos é particularmente desafiadora por eles serem normalmente muito deformáveis. A Microtomografia Computadorizada de Raios X (microCT) é uma técnica muito interessante nesse sentido, pois ela possibilita a análise de milhares de planos/seções microtomográficas e visualização tridimensional interna do material a ser estudado. É um equipamento que utiliza os mesmos princípios da tomografia hospitalar, entretanto, em pequena escala e com aumento exponencial da resolução [2].

Diante do exposto, o artigo em questão tem como objetivo apresentar a microCT como técnica para caracterização de arcabouços, explicando as principais vantagens e desvantagens e comparando com outras técnicas utilizadas por pesquisadores.

II. CARACTERÍSTICAS MICROESTRUTURAIS RELACIONADAS À POROSIDADE

A. Descrição qualitativa de um sólido poroso

Para ser poroso, o material deve conter cavidades, canais ou interstícios, todavia é importante estar atento quanto as distinções referentes ao tipo de poro, para melhor classificar o material poroso e evitar possíveis ambiguidades.

Os poros podem ser classificados de acordo com o quão acessíveis eles são a um fluido externo. Na figura 1, o poro a

é um poro fechado, inacessível a um fluido e totalmente isolado dos seus vizinhos. Esse tipo de poro influencia propriedades como densidade, elasticidade, resistência mecânica e térmica e condutividade. Em contrapartida, há os poros abertos, com um canal navegável que se comunica externamente, como é o caso de *b*, *c*, *d* e *f*. Os poros abertos podem ser classificados também como poros interconectantes e poros cegos. Os poros interconectantes, que começam em um local e terminam em outros são mostrados no percurso *c-e-c* ou *c-e-d*. Já os poros cegos, como *b* e *f*, estão abertos para a superfície apenas em uma das extremidades. A região *g* também é definida como poro cego, embora seja chamada de rugosidade da superfície [3].

Na engenharia tecidual, poros fechados e cegos prejudicam o crescimento em profundidade do tecido e também impedem a circulação de nutrientes e metabólitos e excretas. Por esse motivo, o ideal é que os poros de um arcabouço tenham alta interconectividade.

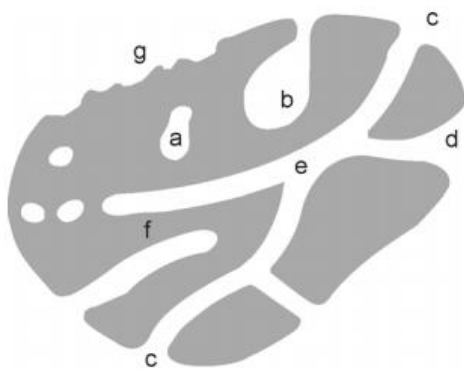


Figura 1: Seção esquemática transversal de um sólido poroso.
Fonte: adaptada de [3].

B. Descrição quantitativa de estruturas de poros

A porosidade é definida como a fração ε do um volume específico de uma amostra que é atribuído aos poros $\varepsilon = V_p / V$. Essa proporção irá depender do método usado para determinar o volume específico aparente V , e do método usado para avaliar o volume específico de poro V_p . Alguns métodos fornecem maiores informações sobre poros abertos, outros avaliam tanto poros fechados como os abertos. Além disso, a técnica escolhida para a medição também pode influenciar o valor do volume do poro medido. Portanto, o valor de porosidade pode depender do material e o método experimental utilizado.

Além da porosidade, é possível determinar a área de superfície específica, indicada como a área da superfície detectada por unidade de massa do material. Não diferente da porosidade, o valor da área também depende do método utilizado para a medição, e de outros fatores como condições experimentais empregadas. Medir a superfície e o tamanho dos poros é um desafio enfrentado ao analisar a microestrutura, visto que as formas dos poros geralmente são irregulares e variáveis. Na maioria das aplicações, a menor dimensão é referida como a largura do poro e para realizar a classificação do tamanho desses poros, alguns autores adotaram os seguintes parâmetros [3]:

- Microporos: largura < 2 nm
- Poros médios: 2 nm < largura < 50 nm
- Macroporos: largura > 50 nm

Levando tais parâmetros descritivos em consideração, um arcabouço ideal deve ter alta porosidade (porém sem que isso comprometa o manuseio da amostra ou as propriedades mecânicas desejadas), elevados valores de área superficial, que tendem a favorecer a adesão e proliferação celular, e um tamanho de poro adequado à aplicação desejada. Portanto, o levantamento dessas características é de extrema importância na área de engenharia tecidual. Como diferentes técnicas, baseadas em diferentes princípios físicos, podem fornecer informações diferentes e também podem causar influências nas medições, é preciso conhecer bem as opções e saber adequar a escolha ao material utilizado e à aplicação desejada.

III. PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE POROSIDADE

A. Microscopia eletrônica de varredura

Este equipamento utiliza um feixe de elétrons focalizado para varrer a superfície da amostra, de tal forma que a interação com a matéria gere informações sobre a morfologia e a composição química do material. Trata-se de uma das técnicas mais utilizadas para caracterização de arcabouços atualmente, dada a qualidade da resolução da imagem gerada, e a variedade de informações que pode ser obtida. Todavia, para a análise interior do arcabouço, é necessário seccioná-lo, podendo ocorrer uma compressão desnecessária e ocasionando efeitos de borda na arquitetura que podem comprometer os resultados. Essa desvantagem impossibilita o uso da estrutura para os outros testes. Além disso, alguns estudos também mostraram que em alguns arcabouços fabricados com a técnica de FDM (*Fused Deposition Modeling*), não é possível obter uma análise mais completa da amostra [2], [4].

B. Porosimetria por mercúrio

Esta técnica é muito conhecida e usada para estudar materiais porosos através da inserção de mercúrio, um líquido não umectante e que entra nos espaços dos poros apenas por pressão. A técnica consiste em introduzir a amostra em um penetrômetro com evacuação de gás enquanto o fluxo de mercúrio o percorre. Durante esse processo, a pressão ambiente é aplicada e a amostra é envolvida por mercúrio, ou seja, a pressão necessária para introduzir mercúrio dentro da amostra é inversamente proporcional ao tamanho dos poros. Por utilizar pressão, ela também não é indicada para materiais altamente compressíveis, como é o caso de arcabouços poliméricos. Além disso, é uma técnica perigosa e destrutiva, visto a toxicidade do mercúrio, e a necessidade de ter instalações especializadas para realizar a descontaminação da amostra [2].

C. Picnometria

Picnometria é uma técnica que determina a densidade através da medição precisa do volume de sólidos. Apesar de ser reconhecido como dispositivo para medir densidade de sólido, também mede o volume por meio do cálculo da relação entre massa e volume. A massa é medida por pesagem, e o cálculo do volume é feito medindo a alteração na pressão experimentada pelo fluido em virtude do deslocamento do mesmo pela amostra em estudo. No entanto, a técnica não consegue contabilizar poros fechados, e por isso não é possível obter certas informações. Visto suas

limitações, é necessário a junção de outra técnica, como microCT, para obter resultados mais satisfatórios [2], [5], [6].

Uma alternativa às técnicas descritas é a microCT. Em estudos recentes, pesquisadores empregaram essa técnica na avaliação dos arcabouços e notaram algumas vantagens comparada às técnicas anteriores. Dentre as vantagens da microCT, destacam-se a ausência de compressão, destruição, corte e uso de produtos tóxicos na amostra durante o processo de aquisição das imagens e a habilidade de gerar uma avaliação mais conclusiva do arcabouço, ou seja, a apresentação de uma maior quantidade de detalhes quanto às propriedades das amostras [7]–[9].

Diferentes técnicas podem ser combinadas de modo a alcançar o estudo aprofundado das propriedades dos arcabouços. Entretanto, notou-se que a microCT sozinha pode cumprir potencialmente a função de fornecer um conjunto abrangente de dados sem destruir a amostra a ser analisada. A Tabela 1 apresenta as principais informações disponíveis para as principais técnicas utilizadas para caracterização de arcabouços.

TABELA 1 - Informações disponíveis de acordo com cada técnica.

Técnica	Informações disponíveis
Microscopia eletrônica de varredura	Forma Tamanho e distribuição dos poros Porosidade
Porosimetria	Porosidade Distribuição dos poros Diâmetro dos poros Área total da superfície dos poros Interconectividade
Picnometria	Volume do poro Porosidade
Microtomografia computadorizada	Forma Tamanho e distribuição dos poros Porosidade Área de seção transversal Visualização de poros cegos

Fonte: Adaptado de [10]

IV. MICROCT: PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO E ESTADO DA ARTE

Os ganhadores do Prêmio Nobel em fisiologia ou medicina em 1979, Allan Gormack e Godfrey Hounsfield, foram os primeiros a desenvolver a tomografia computadorizada (TC), usada para revelar a estrutura interna de amostras através de projeções bidimensionais de diferentes ângulos [2].

A TC é conhecida por ser uma técnica de imagem não invasiva, que utiliza raios-X para obter imagens de partes internas do paciente, produzindo radiografias transversais que são processadas por um computador. A principal característica que a diferencia da radiografia tradicional é o fato de fornecer muitas imagens do paciente, em diferentes orientações, sucedendo em um conjunto de projeções ou sinogramas. Esse equipamento é capaz de gerar 600 cortes para serem analisados, enquanto um equipamento de radiologia digital consegue tirar somente 1 corte. Com uma resolução superior à da TC, a microtomografia computadorizada (microCT) permite realizar a mesma operação com vários tipos de amostras diferentes. Com a

microCT, é possível atingir resoluções (referentes ao tamanho isotrópico do voxel) que variam entre 400 nm a 70 um [11].

A microCT possui um gerador de raios-X, suporte de amostra, detector, câmera CCD (*charge-coupled device*) e filtro. Os raios X gerados atravessam a amostra, criando projeções de sombra na câmera do detector/CCD. Tanto a amostra quanto o detector podem ser girados para obter outra projeção. A aquisição da imagem da estrutura completa em 3D depende da rotação do equipamento, que pode estar em 180° ou 360°. A Figura 2 ilustra os 5 elementos básicos da microCT (2).

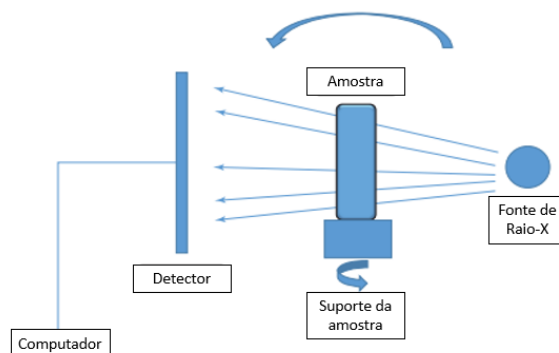


Figura 2 - Elementos básicos da microCT
Fonte: adaptado de [2].

A caracterização por microCT depende de três processos: aquisição, reconstrução e análise. Antes da obtenção da imagem do arcabouço é importante prepará-lo de tal forma que ele não se mova durante o processo, evitando possíveis artefatos de imagem. Após isso, um *software* faz a reconstrução das imagens através de algoritmos. A imagem reconstruída pode ser então visualizada e analisada utilizando *softwares* como o ImageJ [12].

Este equipamento foi usado pela primeira vez no estudo da estrutura óssea trabecular e dados estruturais puderam ser extraídos/derivados após a digitalização das amostras, e desde então vem sendo utilizada para diversas aplicações na área de engenharia tecidual. Posteriormente, outros autores utilizaram a técnica para análise da evolução de arcabouços de osso após o implante, já em outro artigo, a microCT contribuiu para obtenção de características de osso, músculo, nervo e gordura de ratos. Alguns estudos comparativos mostram a aplicação da microCT para geração de imagens de 3D de tecidos não mineralizados, com e sem coloração de ósmio iodo inorgânico e ácido fosfotúngstico [13].

O estudo de Cengiz, através de uma revisão sistemática, analisou artigos que foram publicados em 2016 e que tinham como foco de estudo avaliar a microestrutura do arcabouço usando a microCT. Os autores guiaram sua busca procurando responder questões como (i) que tipo de dados foram relatados, se eram quantitativos, qualitativos ou ambos, (ii) que tipos de resultados quantitativos, ou seja, se dados morfológicos como porosidade, tamanho de poro, espessura etc. foram relatados no artigo e (iii) se o relatório continha todas as informações necessárias sobre os métodos. Com a busca, conseguiram filtrar 105 documentos, e analisar que a microCT foi usada qualitativamente apenas em 15% dos artigos, 9,5% quantitativamente, e com o restante usando ambos. Após análise dos artigos, observou-se a ausência de

relatórios com detalhes importantes sobre vários parâmetros da microestrutura e que influencia diretamente no estudo do desempenho do arcabouço [12]. Isso mostra que a técnica, apesar de promissora, ainda não é tão difundida e comumente não é dominada pelos pesquisadores que a utilizam.

Embora possua várias vantagens para a análise de arcabouços poliméricos, a microCT também apresenta limitações que devem ser consideradas antes de ser escolhida. Uma delas é a pouca capacidade de absorção de raios-x em amostras de baixa densidade radiográfica. Em virtude disso, algumas amostras requerem etapas como coloração com contraste e estabilização para serem obtidos dados completos após a digitalização delas pela microCT. Na Tabela 2 é possível obter os principais desafios e soluções encontrados para o processo de caracterização de arcabouços utilizando a técnica de micro CT.

TABELA 2 - Desafios e Soluções para caracterização de arcabouços com a micro CT.

<i>Desafios</i>	<i>Soluções</i>
Artefatos e ruídos	- Preparo adequado da amostra, com montagem que garanta que ocorra não movimentos durante a rotação do equipamento; - Treinamento do usuário e utilização de parâmetros corretos.
Caracterização de tecido mole, amostras muito finas/leves ou um hidrogel	- Utilização de agentes contraste ou sondas com alto número atômico
Comparação de resultados da micro-CT de diferentes estudos com parâmetros não idênticos	- Protocolo com valores fixos de parâmetros
Caracterização de amostras muito densas/espessas	- Como não é possível utilizar o contraste, um filtro pode ser uma solução, mas também afetará o tempo de aquisição. - A amostra pode ser cortada;
Volume limitado de amostra para análise única	- Adaptação do tamanho da matriz de exibição e/ou tamanho do pixel - Ajuste da porção representativa da amostra
Sobreposições em valores de escala de cinza em amostras com vários materiais	- Usar protocolo de segmentação avançado.
Manutenção e compartilhamento de dados da micro CT	- Mensurar a duração da caracterização do micro-CT e requisitos de espaço de em disco.

Fonte: Adaptado de [12]

CONCLUSÃO

A busca por técnicas que consigam fornecer informações importantes sobre a microestrutura dos arcabouços tem sido alvo de diversos estudos, visto a aplicação dessas estruturas para regeneração de tecidos e órgãos.

A caracterização de arcabouços por microCT é uma área que ainda está em desenvolvimento e com acesso limitado, porém vem ganhando destaque e tende a se tornar mais procurada visto sua vantagem em não destruir ou danificar a amostra durante a caracterização, além da gama de características que é possível obter após a digitalização da imagem.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Educação Tutorial do curso de Engenharia Biomédica e à Universidade Federal de Uberlândia, pela concessão do auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] J. P. Vacanti and R. Langer, "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *Lancet*, vol. 354, pp. S32–S34, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(99)90247-7.
- [2] S. T. Ho and D. W. Hutmacher, "A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds," *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1362–1376, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.035.
- [3] P. Klobes, K. Meyer, and R. G. Munro, *Porosity and specific surface area measurements for solid materials*. NIST Recommended Practice Guide., 2006.
- [4] ASTM F3259-17: Standard Guide for Micro-computed Tomography of Tissue Engineered Scaffolds. ASTM international. West Conshohocken, PA, 2017
- [5] I. M. T. S. Labs, "Pycnometry." <https://www.italabs.co.uk/services/pycnometry/>.
- [6] S. S. Sreedhara and N. R. Tata, "A Novel Method for Measurement of Porosity in Nanofiber Mat using Pycnometer in Filtration," *J. Eng. Fiber. Fabr.*, vol. 8, no. 4, p. 155892501300800, Dec. 2013, doi: 10.1177/155892501300800408.
- [7] J.-T. Schantz, S. H. Teoh, T. C. Lim, M. Endres, C. X. F. Lam, and D. W. Hutmacher, "Repair of Calvarial Defects with Customized Tissue-Engineered Bone Grafts I. Evaluation of Osteogenesis in a Three-Dimensional Culture System," *Tissue Eng.*, vol. 9, no. supplement 1, pp. 113–126, Aug. 2003, doi: 10.1089/10763270360697021.
- [8] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, and S. H. Teoh, "Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications.," *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1169–85, Feb. 2002, doi: 10.1016/s0142-9612(01)00232-0.
- [9] J. Fonseca, C. O'Sullivan, M. R. Coop, and P. D. Lee, "Non-invasive characterization of particle morphology of natural sands," *Soils Found.*, vol. 52, no. 4, pp. 712–722, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.sandf.2012.07.011.
- [10] ASTM F2450-18: Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products. ASTM international. West Conshohocken, PA, 2018
- [11] K. Orhan, K. de Faria Vasconcelos, and H. Gaêta-Araujo, "Artifacts in Micro-CT," in *Micro-computed Tomography (micro-CT) in Medicine and Engineering*, Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 35–48.
- [12] I. F. Cengiz, J. M. Oliveira, and R. L. Reis, "Micro-CT – a digital 3D microstructural voyage into

scaffolds: a systematic review of the reported methods and results,” *Biomater. Res.*, vol. 22, no. 1, p. 26, Dec. 2018, doi: 10.1186/s40824-018-0136-8.

[13] A. du Plessis, C. Broeckhoven, A. Guelpa, and S. G. le Roux, “Laboratory x-ray micro-computed

tomography: a user guideline for biological samples,” *Gigascience*, vol. 6, no. 6, Jun. 2017, doi: 10.1093/gigascience/gix027.