



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E
SISTEMAS**



ANDERSON CUNHA DOS SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO POR MICROTOMOGRAFIA
COMPUTADORIZADA E HISTOMORFOMETRIA DO REPARO DE
DEFEITOS ÓSSEOS APÓS A IMPLANTAÇÃO DE BIOMATERIAIS**

Salvador
2014

ANDERSON CUNHA DOS SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO POR MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA E HISTOMORFOMETRIA DO REPARO DE
DEFEITOS ÓSSEOS APÓS A IMPLANTAÇÃO DE BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa

Salvador
2014

ANDERSON CUNHA DOS SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO POR MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA E HISTOMORFOMETRIA DO REPARO DE
DEFEITOS ÓSSEOS APÓS A IMPLANTAÇÃO DE BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Aprovada em 02/12/2014

Banca Examinadora

Fabiana Paim Rosa - Orientadora _____

Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Universidade Federal da Bahia

Joni Augusto Cirelli _____

Doutor em Periodontia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Paulo Sérgio Flores Campos _____

Doutor em Diagnóstico Bucal, sub-área Radiologia, pela Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Ao Universo (DEUS), pelas oportunidades e lições.

Aos bons irmãos espirituais e anjos da guarda pela força, ajuda e encorajamento.

Aos meus pais, especialmente minha mãe, por sempre acreditar e investir em meu potencial muito antes de chegar até aqui.

Ao meu padrinho que acompanhou o processo de construção do trabalho e sempre me apoiou, minha tia Cris, minha prima Amanda e meu “primo” Mateus que também me ajudou neste processo.

A minha prima Rebeca e seus “irmãos” Suelen, Rafael e Alana pelo apoio, estímulo e companheirismo nos momentos de crise.

A minha avó, meus tios, tias e madrinha por compreenderem minhas ausências.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa, pela dedicação, pelos ensinamentos e confiança, pela contribuição e exemplo para minha vida acadêmica.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pelo tempo dedicado à análise histológica deste trabalho e à cessão do Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), para o processamento histológico dos espécimes.

Aos pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF): Alexandre Malta Rossi e Sílvia R. Albuquerque Santos, pela produção e concessão dos biomateriais.

Ao Prof. Roberto Paulo C. Araújo, coordenador do programa de Pós-graduação, por todo o auxílio e pela compreensão durante as turbulências.

Aos secretários da Pós Graduação, especialmente Marcelo por sua dedicação e prestatividade.

Às técnicas de laboratório, Elisângela e Cristina, pelos ensinamentos e cuidado no processamento dos espécimes.

Ao Júnior, funcionário do biotério da UEFS, pela eficiência e dedicação. Muito obrigado pela contribuição!

Aos colegas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP - Araraquara): Luana Sabino e Cássio pelo apoio técnico, ensinamentos e companheirismo e a professora Adriana Marcontônio pela parceria, essencial para a viabilidade da pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais: Fúlvio, Isabela, George, Ana Flávia, Luisa, Suelen, Milena, Evelyn, Ysis e recentemente Adila, pelos ensinamentos, parceria e estímulo. Em especial a Renata Almeida e

Iorrana Ribeiro, por dividir comigo também as alegrias e dificuldades deste período, e pela parceria de sempre.

A Elvira Alves que nos momentos cruciais do trabalho esteve presente me ajudando e apoiando.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial, Maurício Campos, Giovanna Bendocchi, Manuela Castro, Juliana Leal, Taís Cunha pela amizade e companheirismo neste período.

Ao professor Guillermo Lopez que sempre me incentivou a fazer esta pós-graduação.

Ao meu Amigo e Às Tuffy Mamede, parceiro na disciplina “Bioengenharia Tecidual”, que sempre me incentivou e iluminou os meus caminhos nos momentos mais difíceis.

Aos meus Amigos Ciro, Leila, Cicero, Everaldo, Juliel, Nívea, Paulo Geambastiani, Mianga que me estimularam e torceram por mim neste processo. Agradeço a paciência de vocês!

Aos novos colegas e amigos de Feira de Santana pela companhia, ajuda e estímulo neste caminho.

A CAPES, CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigado!

SANTOS, Anderson Cunha dos. **Estudo por microtomografia computadorizada do reparo de defeitos ósseos após a implantação de biomateriais**. Salvador, 2014. 44 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2014.

RESUMO

Defeitos ósseos críticos, representam um problema clínico recorrente. Nestas situações a capacidade de reparo ósseo torna-se limitada e suscetível a falhas. No caso supracitado são utilizados biomateriais a base de hidroxiapatita, em função de sua composição química, morfologia porosa tridimensional e alta similaridade com o osso humano. A alta resolução das técnicas de imagem por μ CT, permitem a avaliação de massa óssea e na morfologia dos espécimes excisados, e traz como vantagens: a medição direta da morfologia trabecular em três dimensões e um volume significativamente maior de amostra é analisada. O objetivo deste estudo foi realizar um estudo comparativo imagiológico por microtomografia computadorizada (μ CT) e a análise histomorfológica, do reparo ósseo, associado ao uso de biomateriais. Para a realização deste estudo, foi utilizada uma amostra de vinte ratos, *Rattus Novergicus*, wistar, para a comparação de quatro grupos distribuídos aleatoriamente, avaliados nos ponto biológico de 15 dias. Dois grupos com defeito crítico preenchidos com os biomateriais: compósitos de hidroxiapatita com 1% de alginato e gelatina (1%) (HAAIgeGel) e BioOss[®] (HA), um grupo com o mesmo defeito sem implante de biomaterial e um grupo com a calvária íntegra. Os animais foram sacrificados, as calvárias foram submetidas à aquisição de imagens por μ CT. Tal etapa foi realizada em algumas etapas: “Scanning”, reconstrução e análise em 3D, executada pelos programas “N Recon”, “Data Viewer” e “CTan”. Em seguida os seguimentos anteriores foram descalcificados e os cortes histológicos foram analisados pelas técnicas de Hematoxilina (HE) e Eosina, Picrossírios (PIFG) vermelho e Tricromo de masson Goldner e avaliado em microscópio de luz comum. Conclui-se que através da aquisição de imagens por μ TC e análise histomorfológica, foi possível quantificar o reparo ósseo de defeitos críticos sem implantação de biomateriais e nos grupos HA e HAAIgeGel.

Palavras-chave: Microtomografia por Raios-X, Hidroxiapatita, Biomateriais.

SANTOS, Anderson Cunha. **Study computed microtomography repair of bone defects after implantation of biomaterials.** Salvador, 2014. 44 f. il. *Dissertation (Master of Interactive Processes of Organs and Systems) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador. 2014.*

ABSTRACT

Critical defects, represent a recurring medical problem. In these situations the bone repair capacity becomes limited and susceptible to failure. In the above case are biomaterials used hydroxyapatite base, due to its chemical composition, three-dimensional porous morphology and high similarity with human bone. The high resolution of the image by μ CT techniques allow the assessment of bone mass and morphology of specimens excised, and has as advantages: the direct measurement of trabecular morphology in three dimensions and a significantly larger volume of sample is analyzed. The objective of this study was to conduct a comparative study imaginologic computed microtomography (μ CT) and the histomorphological analysis, bone repair, associated with the use of biomaterials. For this study, a sample of twenty rats, *Rattus Novergicus* was used, Wistar, to compare four groups, at random, biologically evaluated in 15 days. Two groups of critical defect filled with biomaterial: hydroxyapatite composites with 1% alginate and gelatin (1%) (HAAIgeGel) and BioOss® (HA), a group with the same defect without biomaterial implant and a group of the calvaria integrates. The animals were sacrificed, the calvaria were subjected to image acquisition by μ CT. This step was performed in a few steps, "Scanning", reconstruction and analysis in 3D, performed by the programs "N Recon", "Viewer Data" and "AWC". Then the previous segments were decalcified and histological sections were analyzed by hematoxylin techniques (HE) and eosin, Picrossisius (PIFG) red and Trichrome Masson Goldner and evaluated in light microscope common. It follows that by acquiring images per μ TC and histomorphological analysis was performed to quantify the bone repair of critical defects without implantation of biomaterials and HA and HAAIgeGel groups.

Keywords: X-Ray Microtomography , Hydroxyapatite, Biomaterials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Grânulos de HAalg Gel.....	24
Figura 2	Confecção do defeito e implantação dos biomateriais.....	28
Figura 3	Microtomografo <i>SkyScan</i> 1176.....	30
Figura 4	Acomodação da amostra na μ TC.....	30
Figura 5	Tela de aquisição da amostra por μ TC.....	31
Figura 6	Tela de seleção de ROI, análise 3D e Morfometria.....	32
Figura 7	Desenho esquemático do defeito crítico em calvária de rato.....	33
Figura 8	Calvária preenchida com HAalgGel, 15D.....	34
Figura 9	Calvária preenchida com HAalgGel, 15D.....	35
Figura 10	Calvária preenchida com HAalgGel, região de maior diâmetro defeito do defeito, 15D.....	36
Figura 11	Calvária preenchida com BioOss [®] , 15D.....	37
Figura 12	Calvária preenchida com BioOss [®] , região de maior diâmetro do defeito, 15D.....	38
Figura 13	Imagens por μ CT em três dimensões, 15 D.....	38
Figura 14	Calvária com defeito crítico vazio, 15D.....	39
Figura 15	Calvária grupo controle, região de maior diâmetro do defeito, 15D.....	39
Figura 16	Calvária com defeito crítico vazio, 15D.....	40
Figura 17	Calvária com defeito crítico vazio, 15D.....	40
Figura 18	Imagem por μ CT em três dimensões, calvária integra.....	41
Figura 19	Calvária integra corte axial da região de confecção do defeito, referente ao maior diâmetro.....	42
Figura 20	Imagem por μ CT em três dimensões, calvária integra, 15D.....	42

Figura 21	Sobreposição do biomaterial, HAAlgGel 15D.....	45
Figura 22	GHAAlgGel 15D.....	45
Figura 23	GHA 15 D a.....	46
Figura 24	GHA 15 D b.....	46
Figura 25	GHA 15 D c.....	47
Figura 26	Controle 15 D a.....	47
Figura 27	Controle 15 D b.....	48
Figura 28	Calvária Inteira.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre os grupos das medidas obtidas pela μ CT	43
Tabela 2	Comparação entre os grupos das medidas obtidas pela histomorfometria	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15 D	15 dias
3D	Três Dimensões
ad libitum	Expressão latina que significa “à vontade”
BO	Borda óssea
CBPF/RJ	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas/Rio de Janeiro
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais
G	Grânulos
Goldner	Tricômico de Masson-Goldner
HA	Hidroxiapatita
HAAIgGel	Defeito crítico e com biomaterial compósito de hidroxiapatita e alginato a 1%, com gelatina (1%), em formato de grânulos.
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
No	Neoformação óssea
PIFG	Picrossírius <i>red</i>
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
Vc	Vaso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA.....	15
2.2 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO.....	18
2.3 BIOMATERIAIS.....	20
3 OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 AMOSTRA.....	22
4.2 BIOMATERIAIS.....	23
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAL GRÂNULO DE HAAIgGel.....	26
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA BOVINA BioOss®	26
4.5 TÉCNICA CIRÚRGICA PARA A CONFECÇÃO DO DEFEITO.....	26
4.6 TECNICA MICROTOMOGRÁFICA.....	29
4.6.1 Preparo das amostras.....	29
4.6.2 Aquisição das imagens por raios X e reconstituição das seções de μ CT	29
4.6.3 Análise e Imagens 3D.....	31
4.6 ANALISE HISTOLÓGICA.....	32
5 RESULTADOS	34
5.1 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA.....	34
5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	50
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Dentre os vários métodos de diagnóstico utilizados na clínica para avaliar a neoformação óssea, em áreas de defeito ósseo, podem-se citar: as biópsias, a sondagem clínica, o acesso cirúrgico e exames por imagem, como as radiografias e tomografias computadorizadas. No intuito de abster o paciente de morbidades adicionais são eleitos métodos não invasivos, dos quais, evidenciam-se os exames radiográficos (OLIVEIRA, 2010).

Até a atualidade, as técnicas histológicas quantitativas foram o padrão ouro para avaliar arquitetura do osso trabecular e cortical (NOGUEIRA et al., 2010). Não obstante, essas análises fornecem informações únicas sobre a celularidade e os índices dinâmicos de remodelação óssea. Contudo, esta técnica possui limitações como, por exemplo, a invasibilidade clínica e a avaliação da microarquitetura óssea, em razão dos parâmetros estruturais serem provenientes da análise estereológica de alguns pontos em bidimensionais (2D) (BOUXSEIN et al., 2010).

A alta resolução das técnicas de imagem tridimensionais (3D), como a microtomografia computadorizada (μ CT), permite a avaliação de massa óssea e a morfologia dos espécimes excisados, trouxe como vantagens: a medição direta da morfologia trabecular em 3D e análise de um volume significativamente maior da amostra. Assim, medições podem ser realizadas com um rendimento muito mais rápido do que as típicas análises histológicas de parâmetros histomorfométricos e utiliza-se de amostras de osso não descalcificadas, ademais a avaliação da morfologia óssea por varrimento de μ CT não é destrutiva (BOUXSEIN et al., 2010).

Defeitos ósseos críticos provenientes de traumas ósseos, ressecção de tumores e anormalidades congênitas representam um problema clínico recorrente (BI et al., 2012). Nestas situações, a capacidade de reparo ósseo torna-se limitada e suscetível a falhas, o que pode resultar em defeitos ósseos, por vezes, com morfologia complexa que impedem serem reconstituídos de forma espontânea e promover, desta forma, a regeneração óssea (GUIMARÃES et al., 2011).

Com o propósito de formar, recuperar e/ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas configurações anatômicas, inúmeras pesquisas são realizadas com a meta de desenvolver ou aperfeiçoar novos materiais

biocompatíveis e que apresentam propriedades de condução óssea, os quais favorecem o reparo dos defeitos ósseos (GUIMARÃES et al., 2011). O emprego de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma opção aos enxertos ósseos, é vantajoso por não prejudicar tecidos saudáveis, por reduzir os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponíveis comercialmente. Alguns são de fácil dissolução e absorção que, concomitantemente, permitem e estimulam a formação óssea (OLIVEIRA et al., 2010).

No decorrer das duas últimas décadas, muitos substitutos sintéticos de tecidos ósseos têm sido elaborados, a maioria com base em fosfato de cálcio, devido a sua adequada biocompatibilidade. Especialmente, a hidroxiapatita (HA) que é utilizada em aplicações clínicas como substituto ósseo para aplicações médicas em decorrência da sua composição química e morfologia porosa tridimensional, além de ser muito similar ao osso humano, fator complicador para análises feitas através de uma imagem radiológica (ARAGÓN et al., 2011).

Tendo em vista a dificuldade de distinguir, após a implantação em um sítio ósseo, o biomaterial hidroxiapatita de um tecido ósseo neoformado, das limitações dos métodos de análises clássicos e das características da μ CT, se faz necessário o estudo da regeneração tecidual através da μ CT comparativamente à análise histológica, após a implantação de biomateriais em defeitos ósseos críticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

O exame de raios X é um método comum e muito utilizado para estimar a condição clínica de osso enxertado. Embora as técnicas radiográficas convencionas sejam não invasivas, elas fornecem apenas imagens bidimensionais e com baixa resolução (HUANG, et al.2013; AL-FOTAWEI et al., 2014). Em contrapartida, a Microtomografia Computadorizada (μ CT) é uma técnica não invasiva que fornece avaliações quantitativas e precisas de amostras tridimensionais (3D) ósseas (HUANG et al., 2013). Este método de análise demonstra ser promissor para a observação das estruturas ósseas microscópicas e quantificação da formação óssea, dentro e fora dos defeitos, o que a torna uma ferramenta valiosa na pesquisa histomorfométrica em animais de pequeno porte *in vivo* (UDAGAWA et. Al., 2012).

A μ CT possibilita estudar características morfométricas de substitutos ósseos como um método de análise não invasivo, não destrutivo e mais preciso que a microscopia ótica tradicional e eletrônica (MALEO et al., 2012). Ferramenta analítica muito útil para medir neoformação óssea (SONG et al, 2014), a μ CT não é a técnica mais adequada para avaliar as células de tecido ósseo, tais como osteóides, osteoblastos, e osteoclastos. Todavia, os estudos na literatura relatam que a μ CT ainda é comparável à histomorfometria estereológica na determinação da quantidade de tecido ósseo (PARK et al., 2014). Introduzida como uma alternativa não destrutiva à histologia, estudos demonstram um alto correlação com parâmetros histomorfométrica convencionais (ANAVI, et al., 2011).

Desta forma, a μ CT é uma escolha conveniente quando se quer medir a qualidade do osso, que envolve aspectos como propriedades minerais, microarquitetura, e composição da matriz óssea (GÓMEZ et al., 2013), também aplicada em pesquisas que envolvem a produção de ossos, amostra de ossos de pequenos animais, amostra de osso trabecular de animais maiores e humanos (KASSECK et al, 2010). Do mesmo modo, a μ CT é capaz de realizar medidas diretas relacionados com osso cortical que inclui: a área cortical, espessura cortical média, área da seção de choque total e fração de volume ósseo cortical e, além disto, medições geométricas tais como a largura, o diâmetro e a espessura,

obtenção de informações usadas para calcular as propriedades do material estão entre as aplicações da μ CT (BART; WALLACE 2013)

As primeiras μ TC foram desenvolvidas no início de 1980, e em todas as suas formas, tornou-se um poderoso instrumento na investigação biomédica (RITMAN, 2011). 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 3D uma imagem da amostra a ser analisada (BOUXSEIN et al., 2010; PARK et al., 2014). As amostras normalmente variam de poucos milímetros a alguns centímetros de tamanho, com resoluções na faixa de micron (DAVIS et al., 2013). A preparação da amostra é tipicamente mínima e para muitos materiais, a técnica é não destrutiva o que permite muitas pesquisas para serem feitas, no mesmo espécime em diferentes condições (LANDIS; KEANE 2010).

A μ TC pode ser classificada quanto à 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 *Synchrotron* é gerada a partir de um anel de armazenamento de elétrons e é monocromática (tendo um comprimento de onda específico). Portanto, diferentes elementos podem ser distinguidos de acordo com seu número atômico (ZEHBE, 2010; YUE, 2010; JIA et al., 2010).

O emprego de raios-X monocromáticos em μ TC, artifício utilizado para aperfeiçoar a aquisição de imagem, possui como vantagens uma alta resolução espacial e quantitativa de imagens por proporcionar alta relação sinal-ruído, forte contraste e desprezível efeito endurecimento do feixe. Um dos problemas no uso desta tecnologia, no entanto, são os tempos de varredura inevitavelmente longos (≥ 10 min), devido ao insuficiente fluxo de fótons de raios-X monocromático, em comparação com o feixe policromático ou quase monocromática de raios-X (JUNG et al., 2012). Além dos inconvenientes citados, a μ TC radiação *Synchrotron* possui o campo de visão limitado, os equipamentos não estão amplamente disponíveis (MANCHENO et al., 2014) e seu custo é elevado (VERDELIS et al., 2011).

A μ TC que utiliza raios-X convencionais de alta resolução é a escolha mais recomendada como recurso não destrutivo para a análise da morfologia óssea, comparada às técnicas convencionais (SALES et al., 2011). Este equipamento reconstrói imagens 3D em planos desejados com uma resolução cem vezes maior do que a Tomografia Computadorizada médica (PANG et al., 2012) e pode alcançar

uma resolução de imagem no valor de $10\mu\text{m}$, ou em torno de $1\mu\text{m}$, quando utiliza a radiação síncrotron (BARBETTA, 2012).

Como é sabido, o osso, o tecido fibroso novo e o arcabouço de cerâmica apresentam diferentes coeficientes de absorção; este método permite a separação de suas estruturas 3D para obter dados quantitativos, tais como o volume do osso, espessura, o crescimento, a destruição, remodelação e alterações na densidade do osso. Sabendo também que imagens com voxel de tamanhos inferiores a $10\mu\text{m}$ são atingíveis com facilidade pela μTC , esta técnica de imagem é superior a outras, tais como ultrassom ($30\mu\text{m}$) e ressonância magnética ($100\mu\text{m}$) (BARBETTA, 2012).

No entanto, a ferramenta da μTC 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, uma outra técnica que emprega a utilização de contraste, em que as amostras são equilibradas numa solução contendo um agente de contraste iônico para tomografia computadorizada (PALMER; GULDBERG; EVENSTON, 2006), amplia o limite de formação de imagem de estruturas "moles" tais como cartilagem e vasos sanguíneos. Junto à morfologia detalhada 3D, as atenuações do voxel local fornecem outro nível de informação sobre o tipo ou a densidade tecidual local analisado (GULDBERG, 2008).

No tocante aos *scaffolds* (arcabouços) analisados em uma imagem de μTC , os parâmetros são o tamanho dos poros, diâmetro de interconexão dos poros e alguma medida de interconectividade, definida como o número de ligações (ao longo de certo diâmetro) por poro (JONES et al., 2009). O método mais comum para a análise de células em arcabouços é a microscopia. O seccionamento seguido por histologia torna possível imaginar o interior dos arcabouços, mas é destrutivo, demorado e apenas semiquantitativo. A microscopia de fluorescência pode ser quantitativa quando são aplicadas abordagens de alto rendimento e a fluorescência confocal microscópica pode produzir imagens em 3D. Contudo, não é possível visualizar através de materiais opacos a imagem do interior de um arcabouço.

A μTC possui a vantagem de gerar imagens 3D e penetrar em profundidade no interior de arcabouços com a primazia de ser um método quantitativo e não destrutivo (SHAUNA et al, 2009). Ademais, a μTC pode ser utilizada para prever as propriedades mecânicas dos materiais e os efeitos da arquitetura dos poros

individuais dos arcabouços se o correspondente possuir as propriedades de um material já conhecido (JONES et al., 2009).

Embora a μ TC seja apresentada na literatura como ferramenta versátil aplicada à bioengenharia óssea com o uso de biomateriais (Appel et al., 2011), em seu trabalho *Potential for Imaging Engineered Tissues with X-Ray Phase Contrast*, demonstraram que as técnicas que utilizam *X-Ray Phase Contrast - X-ray PC* (Raios-X contraste de fase/ Raios-X PC) possibilitam a visualização de tecidos moles, biomateriais e estrutura de tecidos calcificados com excelente resolução espacial, dispensa o uso de contraste com a superação de algumas limitações da μ TC convencional.

O estudo de (Appel et al., 2012) ratifica o potencial da tecnologia de Raios-X PC e destaca a visualização de arcabouços 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*, o uso de Raios-X PC, permitiu a identificação de osso recém-formado dentro do crânio de ratos e a identificação do arcabouço residual do polímero Poli (L-ácido láctico) (PLLA). Assim, pode ser alcançada a segmentação dos defeitos em regiões de ossos, tecidos moles e PLLA. A partir deste resultado, é sugerida, como perspectiva futura, uma importante aplicação para a engenharia de tecidos ósseos com o uso de biomateriais, a quantificação do novo tecido ósseo a ser formado, simultaneamente, a análise do tempo de degradação do polímero utilizado como biomaterial (APPEL, 2012).

Contudo, esta nova tecnologia ainda precisa ser pesquisada e aprimorada, sobretudo quanto à redução do tempo de aquisição de dados e a possibilidade de desenvolver pesquisas em amostras *in vivo* (APPELL et al., 2011; 2012; 2013).

2.2 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

O tecido ósseo possui uma excelente capacidade regenerativa, em variadas situações é capaz de restabelecer perfeitamente sua estrutura óssea arquitetônica e as propriedades mecânicas por meio de um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo (GUIMARÃES et al., 2011). O conceito de defeito ósseo crítico é estabelecido quando o tecido ósseo não regenera

espontaneamente durante a vida do animal. Estes agravos são preenchidos com tecido conjuntivo fibroso e limitam a regeneração óssea nas margens do defeito (EZIRGANL et al., 2013).

Na atualidade, os padrões ouro para o reparo de defeitos ósseos são auto enxerto ou aloenxerto (GELLYNCK, 2013), contudo essas estratégias apresentam limitações como a falta de tecido disponível, morbidade do sítio do doador, riscos de transmissão de doenças e imunossupressão (BI et al., 2012). A engenharia de tecido ósseo surgiu com a finalidade de superar as limitações do uso de enxertos e têm usado abordagens diferentes, como fatores de crescimento e biomateriais utilizados para imitar as características do natural, matriz extracelular óssea (GELLYNCK, 2013).

2.3 BIOMATERIAIS

Uma definição geralmente aceita sobre biomateriais é qualquer substância, natural ou sintética, que abrange o todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, complementa ou substitui uma função natural (MAIA et al., 2010).

Atualmente, os biomateriais são rotineiramente usados em aplicações médicas tais como: a entrega de medicamentos, engenharia de tecidos e tratamentos médicos com base na imagiologia. Muitos materiais orgânicos e inorgânicos, alguns dos quais já estão disponíveis no mercado, foram especificamente projetados para promover o crescimento de tecidos e entrega de medicamentos. É reconhecido que as propriedades dos biomateriais afetam os resultados biológicos incluindo a meia-vida biológica de drogas, biocompatibilidade de dispositivos implantados e as taxas de liberação e toxicidade dos transportadores de remédios (MITRAGOTRI; LAHANN, 2009).

Os materiais cerâmicos, devido a sua natureza inorgânica e composição iônica, são adequados para aplicações ósseas. Os fosfatos de cálcio, tais como hidroxiapatita (HA), fosfato de tricálcio (TCP) e fosfato de cálcio derivado de coral, conhecidos pela sua capacidade de ligação e por estimular a regeneração óssea, são exemplos desses materiais (GIULIANI et al., 2013).

A hidroxiapatita (HA) é uma das biocerâmicas mais biocompatíveis em virtude de sua semelhança ao componente mineral de ossos e dentes humanos (FOOK; APARECIDA; FOOK, 2010). Este biomaterial tem sido utilizado em uma variedade de aplicações biomédicas, como em matrizes para a libertação controlada de fármacos, cimentos de osso, e implantes dentários (VENUGOPAL, 2010). A HA é biodegradável e quimicamente semelhante ao componente inorgânico da matriz óssea – um tecido muito complexo geralmente formulado com $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (ZHOUH; LEE, 2011; NOTODIHARDJO et al., 2012).

Cristais sintéticos de HA são intensamente utilizados em aplicações médicas, como, por exemplo, implantes ou revestimentos sobre próteses. Por conseguinte, as características biológicas: não imunogenicidade, comportamento não inflamatório, boa biocompatibilidade, alta osteocondutividade e/ou osteoindutividade destas HA sintéticas têm sido amplamente pesquisadas (SHI et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo comparativo imaginológico por microtomografia computadorizada (μ CT) e a análise histomorfológica, do reparo ósseo, associado ao uso de biomateriais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através da aquisição de imagens por μ TC e análise histomorfológica:

- Identificar e quantificar o reparo ósseo de defeitos críticos sem implantação de biomateriais.
- Identificar e quantificar o reparo ósseo de defeitos críticos após implantação dos biomateriais: BioOss[®] e compósito de hidroxiapatita com alginato a 1% e gelatina a 1%.
- Diferenciar por densidade, o biomaterial a base de osso bovino inorgânico (BioOss[®]) do tecido ósseo neoformado.
- Diferenciar por densidade, o biomaterial a base de osso fosfato de cálcio (inorgânico), alginato e gelatina (orgânico), em relação ao tecido ósseo neoformado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (PROTOCOLO Nº060/2014) e seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008), as Normas Nacionais de Biossegurança e as Diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publicação n º 85-23, Rev. 1985), bem como as normas de Biossegurança do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no qual foram realizados os procedimentos cirúrgicos deste estudo.

4.1 AMOSTRA

Utilizou-se uma amostra com 20 ratos *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, albinos, machos, adultos, com massa corporal de aproximadamente 321 a 480g, de três a quatro meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UEFS. Os animais foram distribuídos aleatoriamente para a composição de quatro grupos experimentais, no ponto biológico de 15 dias (Quadro 1).

- **Grupo HAAIlgGel:** defeito ósseo crítico preenchido com biomaterial compósito de hidroxiapatita, alginato e gelatina, em formato de grânulos.
- **Grupo HA:** defeito ósseo crítico e com biomaterial de hidroxiapatita bovina, em formato de grânulos (BioOss®).
- **Grupo CDSB:** defeito ósseo crítico e sem implantação de biomateriais.
- **Grupo CI:** calvária íntegra e sem confecção de defeito crítico.

Quadro 1 - Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico

Grupos	HAAIgGel	HÁ	CDSB	CI	Total
15 dias	05	05	05	05	20

Fonte: Elaborado pelo autor

Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em gaiolas identificadas e autoclavadas, forradas com cama de maravalha *de pinus* autoclavada e trocada diariamente. Os animais foram alimentados com ração sólida e água *ad libitum*, mantidos em condições ambientais controladas de temperatura e luminosidade adequadas à espécie. Os animais foram submetidos à eutanásia nos tempos biológicos de 15 dias pós-operatórios.

4.2 BIOMATERIAIS

Os biomateriais utilizados para o experimento foram constituídos por:

1. Grânulos de HAAIgGel compósito de hidroxiapatita com alginato a 1% e gelatina 1% (Figura 1), desenvolvidos, preparados, caracterizados e fornecidos pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) sob a supervisão do Professor Alexandre Malta Rossi.

Figura 1 - Grânulos de HAAlgGel



(A) Grânulos de HAAlgGel acondicionados em tubos plásticos do tipo *ependorfs*. **(B)** Grânulos de HAAlgGel acondicionados no pote *dappen*.

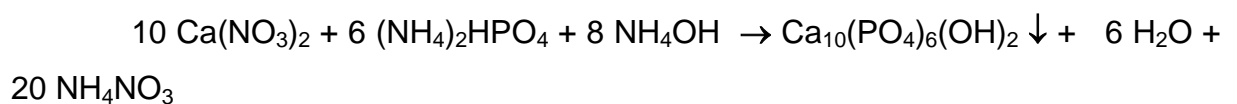
Fonte - Foto do autor

2. Partículas de hidroxiapatita de origem bovina BioOss[®], comercialmente encontrado.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO BIOMATERIAL GRÂNULOS DE HAAlgGel

4.3.1. Preparação do Pó de Hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]

As amostras de hidroxiapatita estequiométrica são sintetizadas pelo método de precipitação por via úmida com razão teórica dos íons [Ca]⁺²/[PO₄]⁻³ = 1,67, em condições reacionais apropriadas à formação de um material com uma única fase cristalina. A reação é ilustrada abaixo:



A síntese é realizada a partir da adição de uma solução contendo íons fosfato **(Solução A)** à uma solução contendo íons cálcio **(Solução B)** em condições reacionais propícias a formação do precipitado. Os detalhes são descritos abaixo:

4.3.2 Preparação das Soluções:

Solução A: 4000 mL de uma solução 2,0 M Nitrato de Cálcio Tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$, ajustados a um pH 10-11 pela adição de 30mL de NH_4OH concentrada.

Solução B: 4000 mL de uma solução 1,2 M de Diamôniohidrogenofosfato de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ajustados a um pH 10-11 pela adição de NH_4OH concentrada.

Durante todo o experimento foi utilizada água ultrapura (Milliq) obtida de um sistema Milli Q-plus/Millipore.

4.3.3 – Preparação do material:

Com o auxílio de uma bomba peristáltica (fluxo:200mL/min) a solução A é colocada dentro do reator com capacidade de 10L, onde será realizada a reação de precipitação. Com o reator já contendo a solução A e sob agitação mecânica com agitador IKA (240rpm) e temperatura mantida através óleo de silicone a 90°C ($\pm 5^\circ\text{C}$), ocorre a adição lentamente da solução B, com auxílio de uma bomba peristáltica (fluxo de 30ml/min), Após três horas de adição, a mistura permanece sob agitação, à mesma temperatura, por mais duas horas para a maturação do precipitado formado.

4.3.4. Filtração e Lavagem do Sólido

O precipitado ainda em solução (volume total de aproximadamente 9L) é retirado do reator com o auxílio de um becher e transferido para um sistema de filtração composto por um funil tipo buchener, kitassato e papel de filtro. A este sistema é acoplado uma bomba de vácuo (Marca: Boc Edwards) e todo o líquido é retirado em sua totalidade, restando um gel de hidroxiapatita.

Utilizando-se um becher com capacidade de 4L, são aquecidos 3L de água Milliq aquecida até temperatura de 90°C , em seguida o material contido no papel de filtro é transferido para o becher e com agitação mecânica fica disperso na água durante 15min. Após este tempo novamente utiliza-se o sistema de filtração já

descrito acima e o precipitado é filtrado sendo medido em seguida o pH do sobrenadante(ou água de lavagem). Esta operação de lavagem é repetida até obter no sobrenadante o pH $\pm 7,0$.

4.3.5. Secagem e Dispersão do Sólido

O sólido obtido é seco em estufa por 24 horas com temperatura de 100°C; o sólido também pode ser liofilizado por 24h. O material seco é triturado em moinho (Marca: IKA) e separado utilizando uma peneira com abertura de 74 μ m mesh.

4.4. GRÂNULOS DE HIDROXIAPATITA BOVINA BioOss[®]

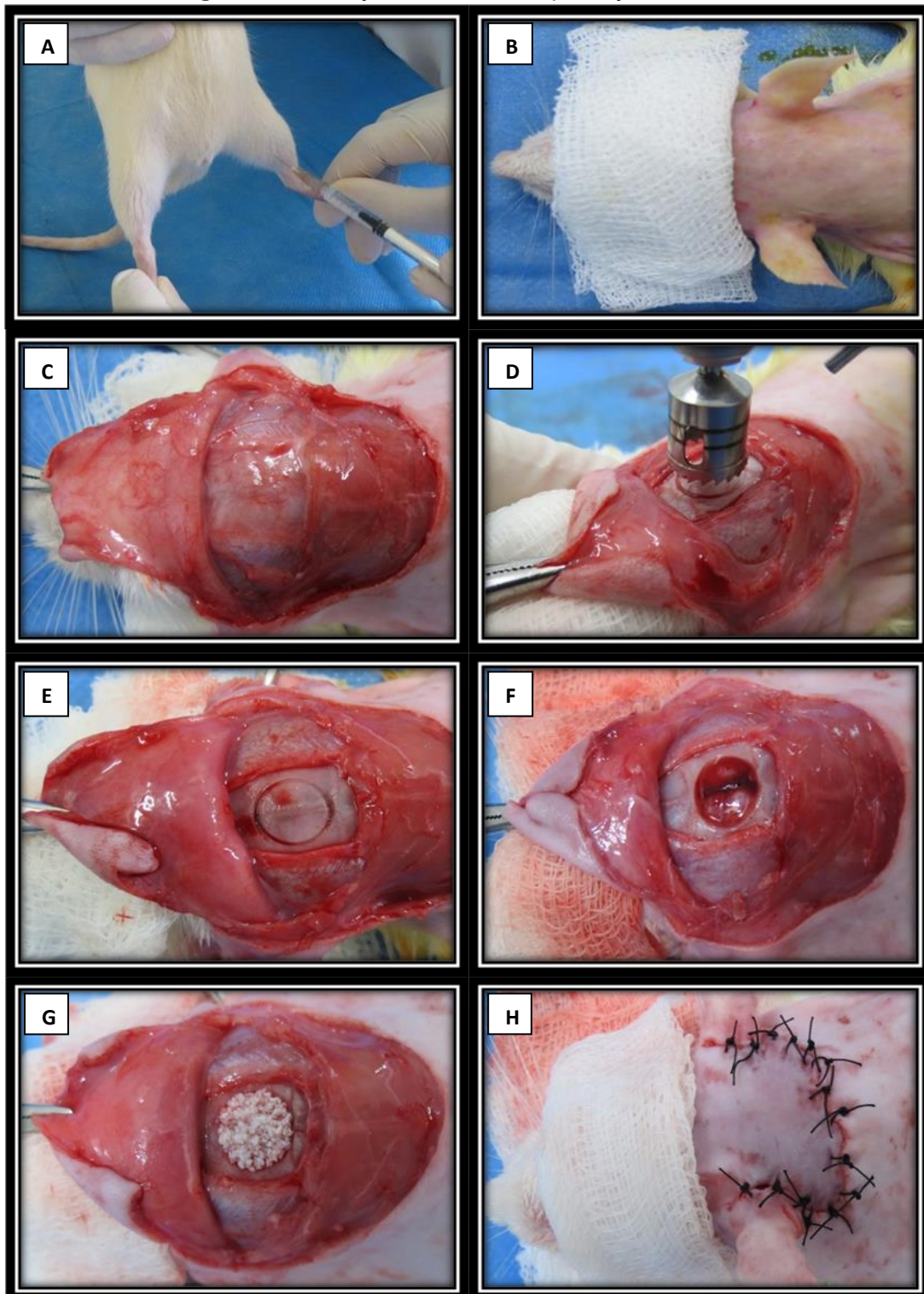
Produzidos com um padrão de tamanho médio, entre 0,25 a 1mm, sendo em seu processamento, desproteinizado e submetido ao tratamento térmico a uma temperatura de 300° C.

4.5. TÉCNICA CIRÚRGICA PARA CONFECÇÃO DO DEFEITO

Inicialmente os ratos foram pesados, anestesiados (Figura 2A) através da injeção intramuscular de Cloridrato de Xilazina (0,06 mL/kg) e Cloridrato de Quetamina (0,12 mL/kg). Posteriormente, fez-se a tricotomia do campo operatório na parte dorsal do crânio, assepsia com álcool iodado (Figura 2B). Com o animal posicionado em decúbito ventral, sobre o campo cirúrgico, foi realizada uma incisão cutânea semilunar de aproximadamente 3cm de extensão, com a utilização de uma lâmina de bisturi n° 15 para a retirada da camada epitelial da calvária (Figura 2C). Realizou-se uma divulsão com tesoura de ponta reta e romba, elevação do retalho para acesso ao perióstio, que foi incisado e removido com uma espátula n° 7 e pinça clínica para exposição do tecido ósseo. Após a incisão foi confeccionado o defeito ósseo crítico de aproximadamente 8,5mm de diâmetro na calvária, com uma fresa trefina de aproximadamente 8,5mm de diâmetro externo (Figura 2D e 2E) acoplada em peça de mão de baixa rotação sob irrigação abundante com solução salina estéril.

Após a confecção do defeito ósseo crítico (Figura 2F) este foi preenchido com o biomaterial de acordo os grupos pré-estabelecidos (Figura 2G). Posteriormente, o retalho foi reposicionado e suturado com fios de nylon, com pontos interrompidos (Figura 2H).

Ao atingir o ponto biológico desejado, os animais sofreram eutanásia com dose letal de Cloreto de Potássio 0,12 mg/kg, via intracardíaca. A calvária foi retirada, as peças fixadas em solução de formol tamponado por 17 dias, lavado em água corrente por um dia e, posteriormente, conservadas em álcool a 70% para serem encaminhadas ao laboratório para análise microtomográfica e depois para processamento histológico.

Figura 2 - Confeção do defeito e implantação dos biomateriais

(A) Analgesia e sedação por meio de injeção intramuscular. **(B)** Tricotomia da região da calvária. **(C)** Tecido ósseo exposto. **(D)** Confeção do defeito ósseo com fresa trefina. **(E)** Demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária. **(F)** Defeito ósseo crítico confeccionado. **(G)** Implantação do biomaterial. **(H)** Sutura do retalho com pontos interrompidos.

Fonte: Fotos do autor

4.6 TÉCNICA MICROTOMOGRAFICA

4.6.1 Preparo das amostras

As amostras conservadas em álcool 70% foram transferidas para uma solução de 0,9% de soro fisiológico e mantidas por no mínimo oito horas no intuito de amenizar a desidratação do tecido ósseo proveniente da fixação em álcool 70%.

4.6.2 Aquisição das imagens por raios-x e reconstituição das seções de μ CT

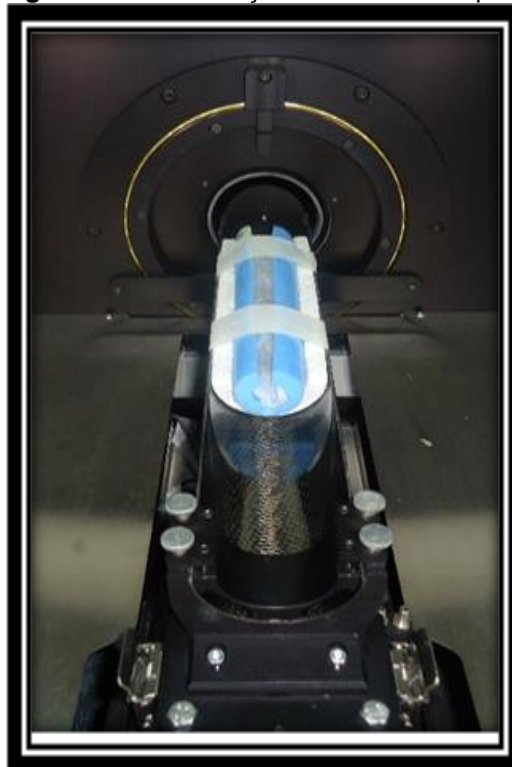
A etapa de aquisição radiográfica por microtomografia computadorizada foi executada em parceria com a Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, no laboratório multiusuário de Microtomografia *in vivo*. A aquisição das imagens foi feita pela Técnica responsável da μ CT, para tanto se utilizou o Microtomógrafo SkyScan 1176 (Figura 3). Inicialmente as amostras são envolvidas em papel absorvente umedecido e após tal procedimento, as mesmas foram colocadas em um suporte e foi fixado na sela do equipamento no intuito de evitar o movimento indesejado para a aquisição das imagens (Figura 4). Fez-se a listagem dos grupos a serem analisados e o registro dos mesmos no computador. Utilizou-se um filtro de alumínio de 0,5mm determinando a kilovoltagem em 50kV e miliamperagem 497 μ A, técnica recomendada para análise de ossos de rato *in vivo* e *ex vivo*. O aparelho foi ajustado para uma resolução espacial máxima de 4000x2672 pixels e cortes com 09 μ m de espessura, cujo tempo de aquisição por peça foi aproximadamente uma hora e vinte minutos (Figura 5). As imagens radiográficas foram reconstituídas pelo uso do *software NRecon*.

Figura 3 – Microtomógrafo SkyScan 1176



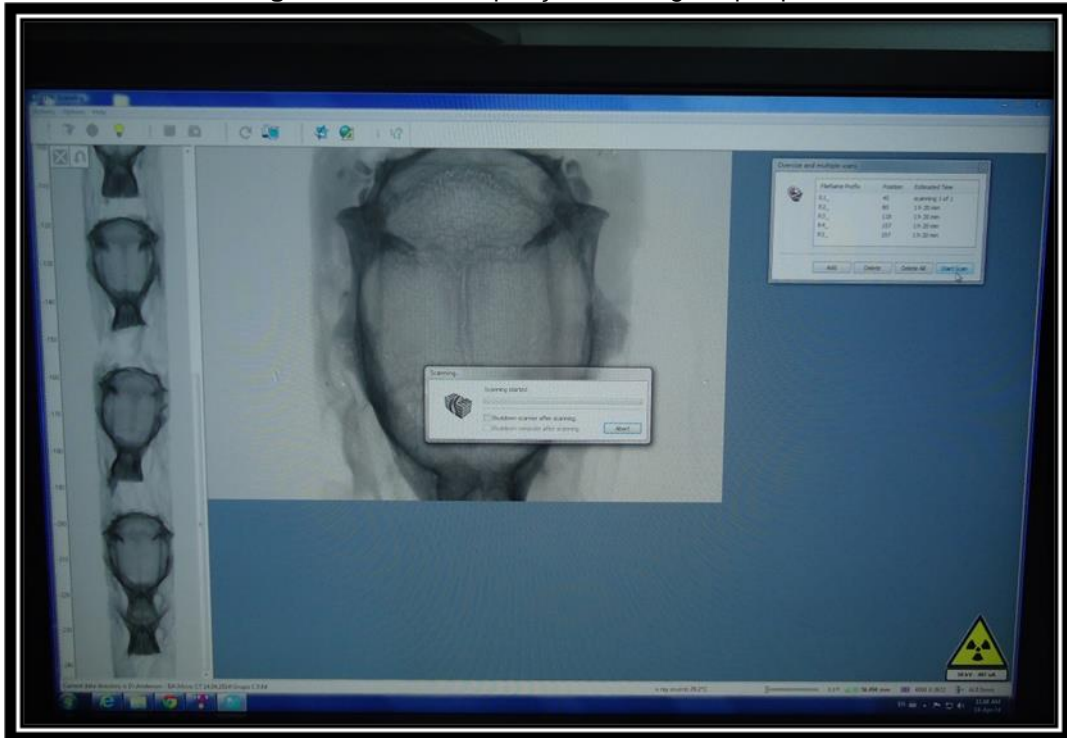
Fonte: fotos do autor

Figura 4 – Acomodação da amostra na μ CT



Fonte: fotos do autor

Figura 5 - Tela de aquisição de imagens por μ CT



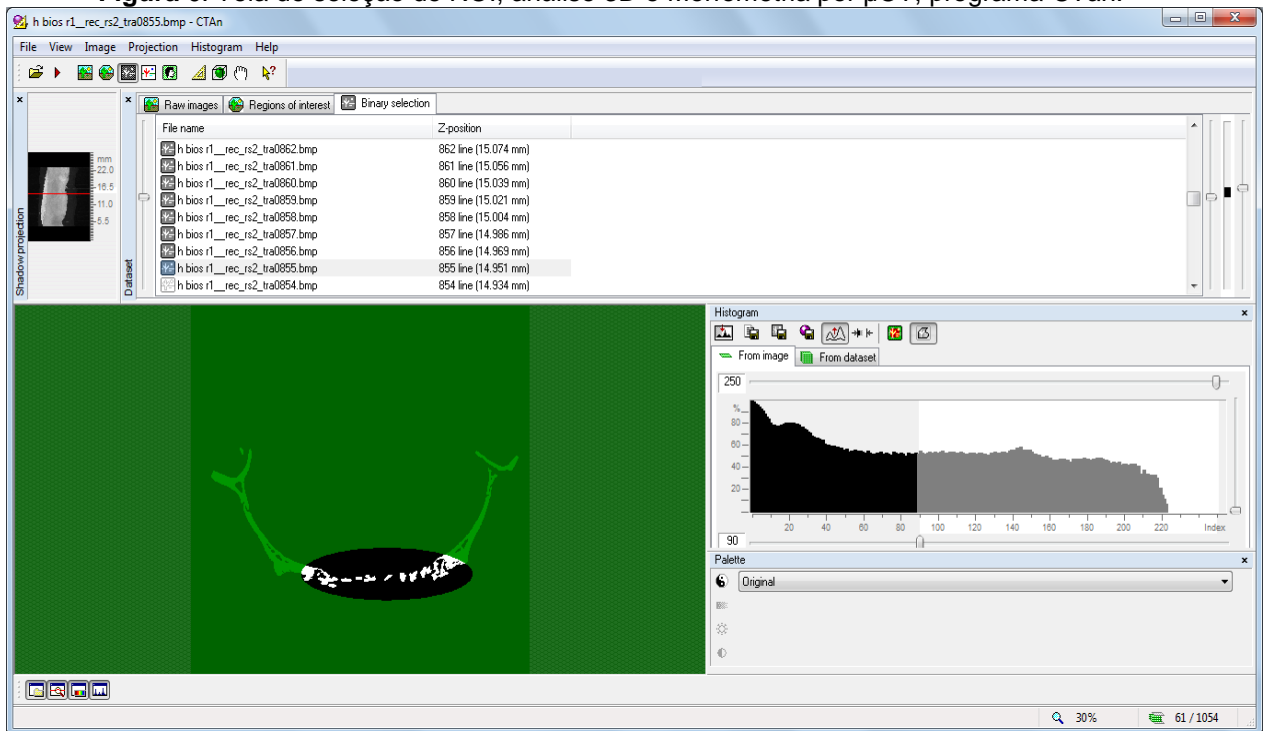
Fonte: fotos do autor

4.6.3 Análise e Imagens em 3D.

Após as imagens passarem pela etapa de reconstruídas no *Software NRecon Server* (versão 1.6.9.8), a mesma é redirecionada no *Data Viewer*. As imagens podem ser salvas em três cortes: axial, sagital e coronal. Neste trabalho foram salvas em axial e sagital.

O próximo passo consiste na análise em 3D que acontece no programa *CTan* (Figura 6), envolve a seleção da região da calvária que se quer analisar (ROI), confecção do histograma, morfometria (feita no plano axial, a partir do maior diâmetro do defeito, similar ao corte histológico) e confecção da imagem delimitada em 3D e que só pode ser manipulada no programa *CTvox*.

Figura 6: Tela de seleção de ROI, análise 3D e Morfometria por μ CT, programa *CTAn*.

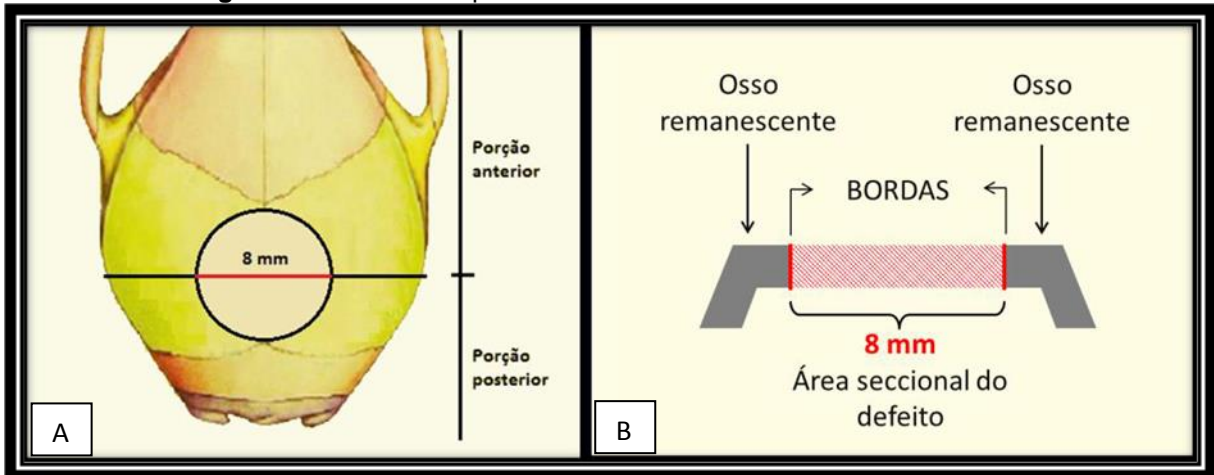


Fonte: fotos do autor

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após as análises microtomográficas, as calvárias foram limpas, reduzidas nas laterais e divididas em duas partes em uma proporção de 2/3 anteriores e 1/3 posterior, em todas as amostras (Figura 7). Os segmentos anteriores das calvárias foram descalcificados com EDTA - 5% por sete dias, com troca a cada vinte e quatro horas, antes de serem incluídos em parafina. Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes seriados longitudinais, com 4 μ m de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original na área com 8,5mm de extensão. Os cortes histológicos foram corados pelas técnicas de Hematoxilina (HE) e Eosina, Picrossírius (PIFG) vermelho e Tricromo de Masson Goldner, analisados histologicamente em microscópio de luz comum. O processamento histológico foi realizado no Instituto de Patologia Geral e Cutânea – IPAC, sob a supervisão da doutora Fabiana Paim Rosa.

Figura 7 - Desenho esquemático do defeito crítico em calvária de rato



Em (A) linha de referência para o corte transversal da calvária no maior diâmetro, 8 mm; em (B) área seccional do defeito, após corte transversal.

Fonte: (A) Adaptado de MENEIL et al. (2005); (B) RIBEIRO, I. I.A, (2013)

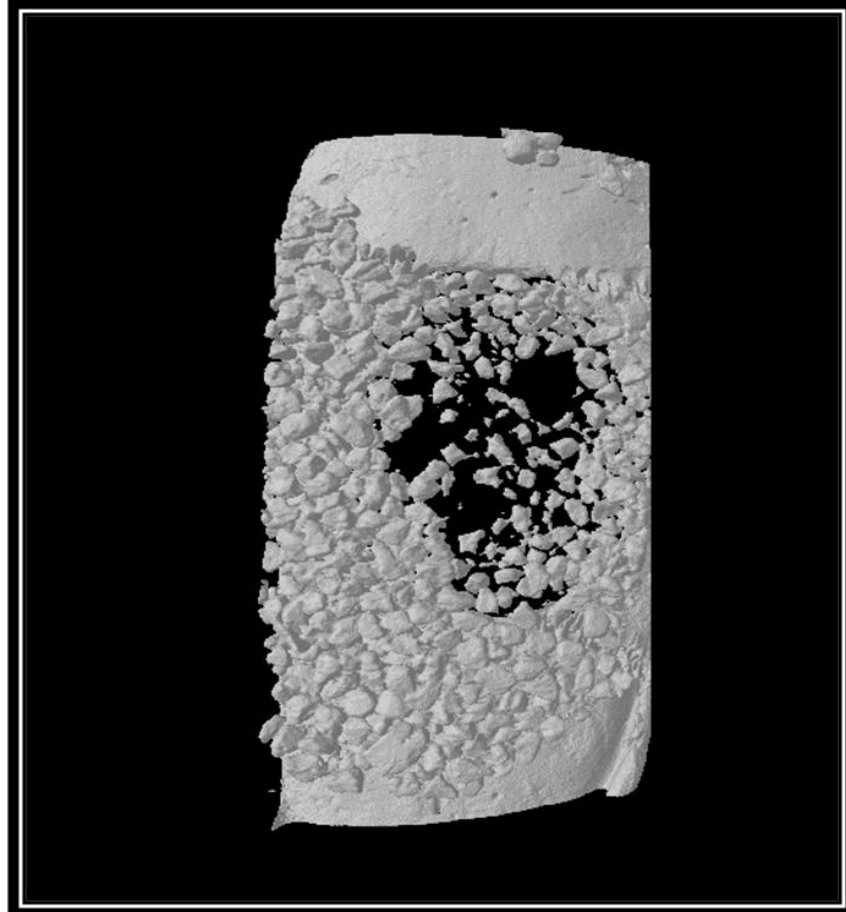
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA

5.1.1 HAALGGel

O grupo HAAlgGel, observou-se o biomaterial com morfologias bem diferentes do tecido neoformado no defeito, sobreposição do biomaterial na região fora do defeito e ausência de biomaterial na região central do defeito, de acordo com a avaliação microtomográfica (Figuras 8, 9 e 10).

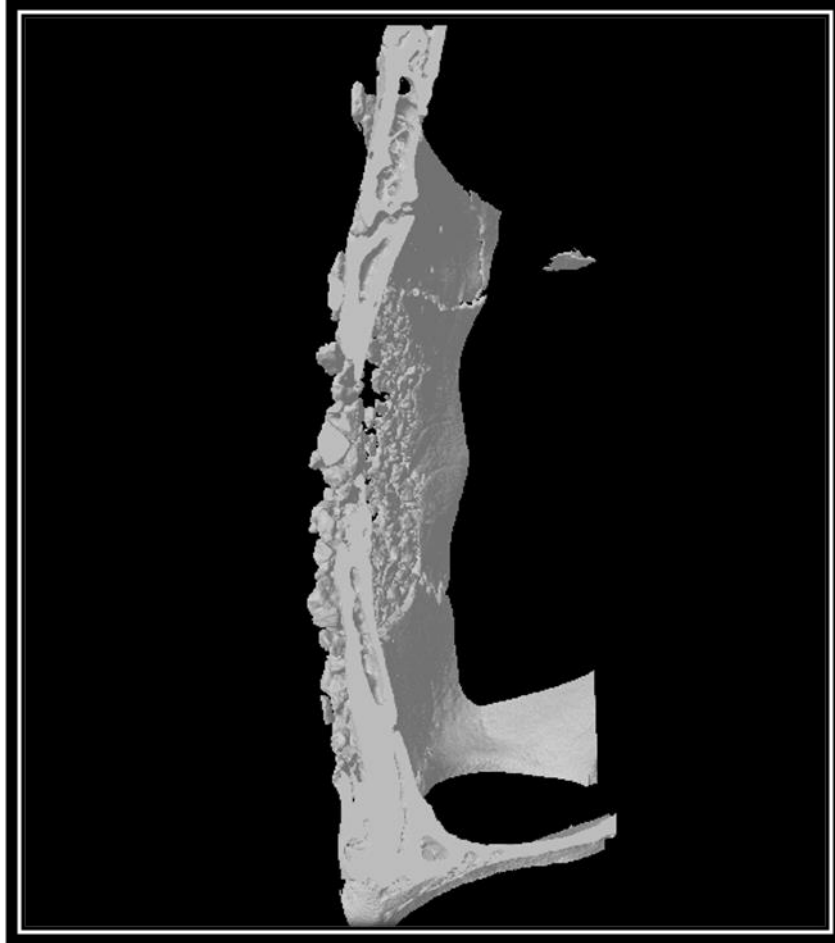
Figura 8 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária preenchida com HAAlgGel, 15D



Visão anteroposterior no plano coronal.

Fonte - Foto do autor

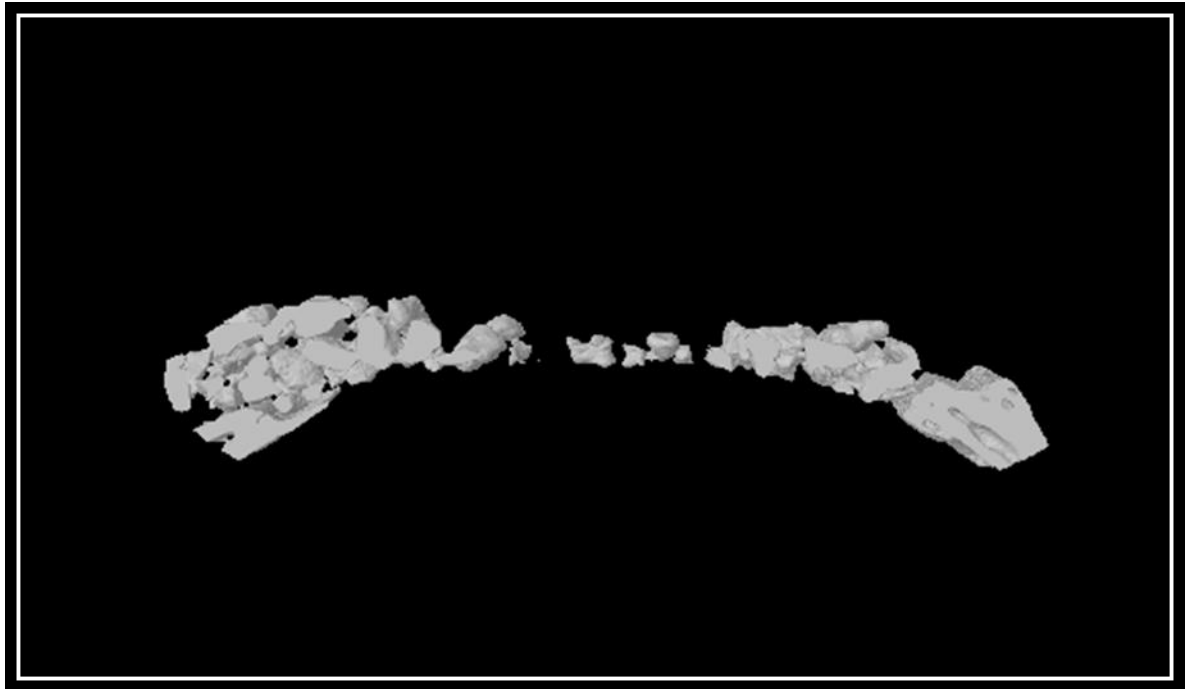
Figura 9. Imagem por μ CT em três dimensões, calvária preenchida com HAAIgGel, 15D



Visão lateral plano coronal.

Fonte: Foto do autor

Figura 10 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária preenchida com HAAIgGel, região de maior diâmetro do defeito, 15D



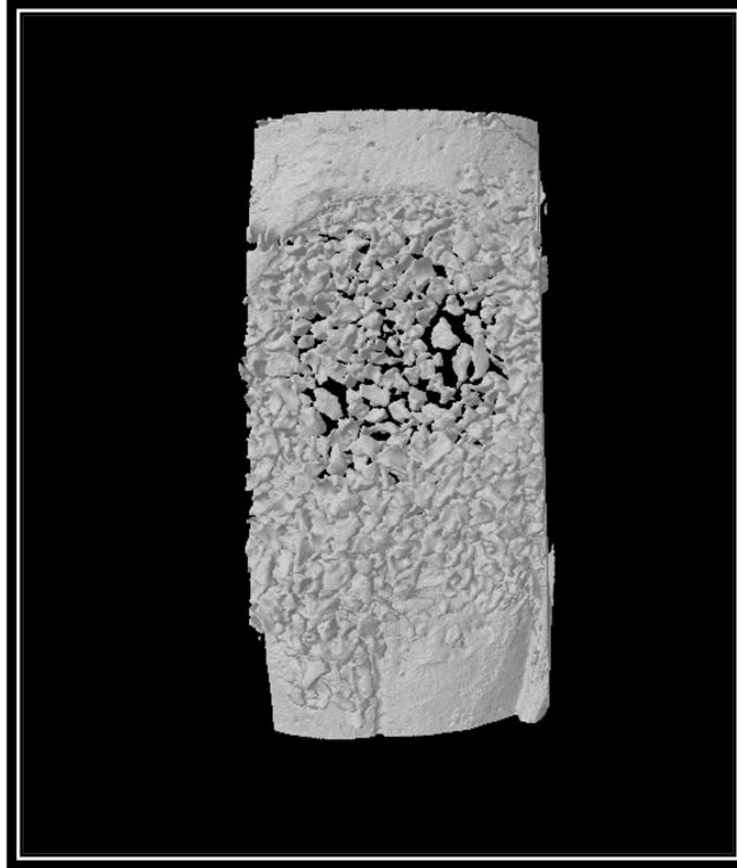
Visão corte axial.

Fonte: Foto do autor

5.1.2 HA (BioOss[®])

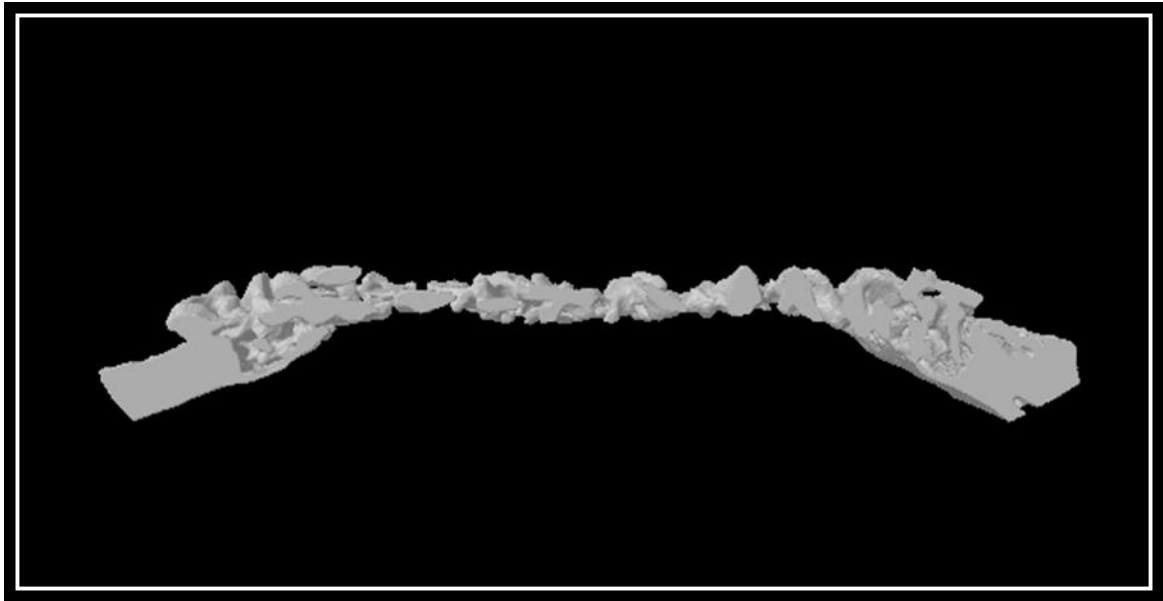
Na imagem microtomográfica em três dimensões do grupo HA, defeito ósseo crítico preenchido com BioOss[®], nota-se uma discreta neoformação na borda óssea, com grande quantidade de biomaterial no interior do defeito. Houve também uma grande quantidade de biomaterial sobrepondo a área fora do defeito (Figura 11 e 12). Observa-se uma similaridade, ligeiramente maior, da radiopacidade com o osso em relação ao biomaterial HAAIgGel. Na imagem comparativa do grupo HA com o grupo controle (Figura 13), é visualizado o preenchimento quase total do defeito pelo BioOss[®].

Figura 11. Imagem por μ CT em três dimensões, calvária preenchida com BioOss[®], 15D.



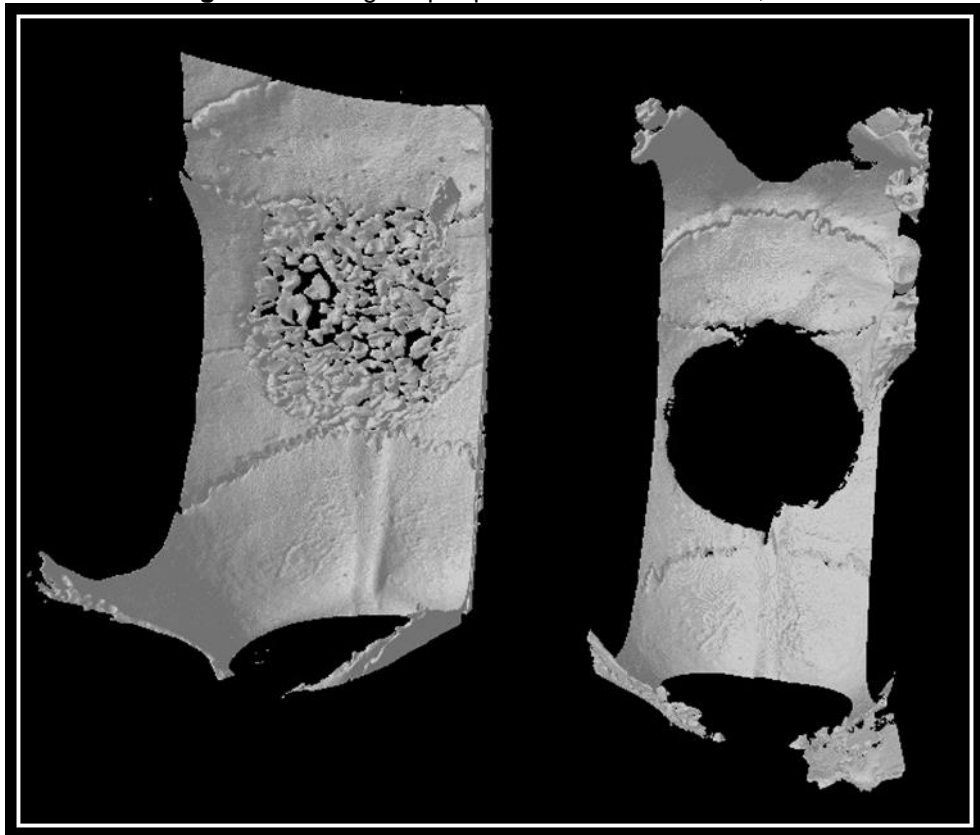
Visão anteroposterior plano coronal. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 12 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária preenchida com BioOss[®], região de maior diâmetro do defeito, 15D



Plano coronal.
Fonte: Foto do autor

Figura 13 - Imagens por μ CT em três dimensões, 15D



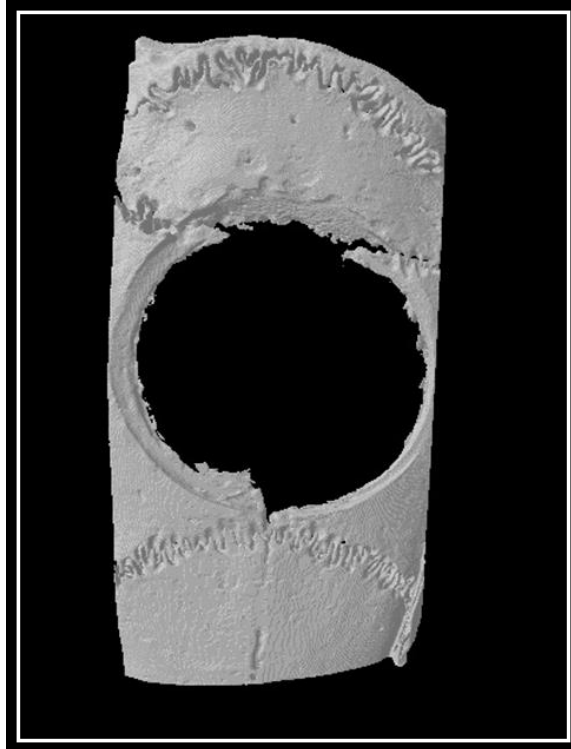
Visão pósterio-anterior no plano coronal da (esquerda) calvária preenchida com BioOss[®] e (direita) Grupo controle, calvária sem implante de biomaterial.

Fonte: Foto do autor

5.1.3 Controle

Nas figuras (14, 15, 16 e 17), são demonstradas imagens 3D do grupo controle, defeito ósseo crítico sem implante de biomaterial, em distintas visões com discreta neoformação óssea nas margens que se apresenta irregular, após 15 D de reparo.

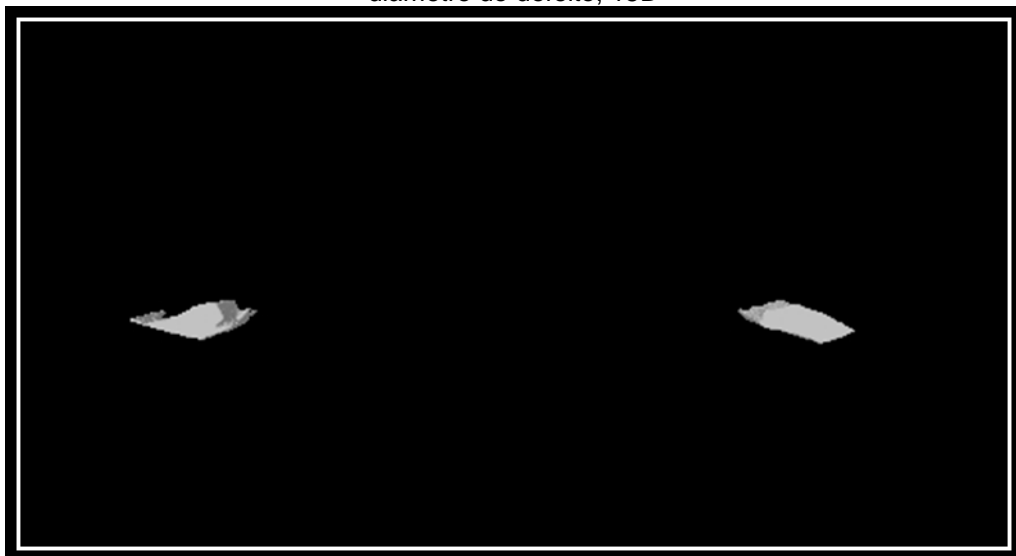
Figura 14 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária com defeito crítico vazio, 15D



Visão anteroposterior plano coronal.

Fonte - Foto do autor

Figura 15 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária preenchida com controle, região de maior diâmetro do defeito, 15D



Corte axial.

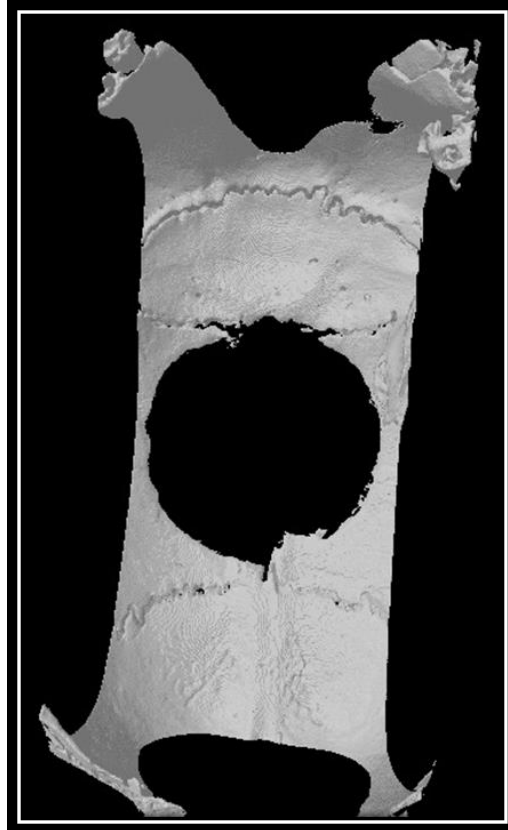
Fonte: Foto do autor

Figura 16 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária com defeito crítico vazio, 15D. Visão sagital



Fonte: foto do autor

Figura 17 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária com defeito crítico vazio, 15D



Visão pósterio-anterior plano coronal

Fonte: Foto do autor

5.1.4 Calvária Inteira

Após avaliação microtomográfica, no grupo calvária inteira, sem confecção de defeito crítico, pode-se visualizar a anatomia da calvária normal, sem irregularidades, as suturas intracranianas bem definidas e uma boa resolução de imagem (Figuras 18, 19 e 20).

Figura 18 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária inteira



Visão anteroposterior plano coronal.

Fonte: Foto do autor

Figura 19 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária integra corte axial da região de confecção do defeito, referente ao maior diâmetro



Fonte: foto do autor

Figura 20 - Imagem por μ CT em três dimensões, calvária integra, 15D



Visão no plano sagital.

Fonte: Foto do autor

A análise morformétrica da μ CT foi calculada a partir do corte axial, da região referente ao maior diâmetro da calvária, simulando um corte histológico. Após comparação das medidas de todos os grupos, o HAAIlgGel apresenta maior volume de tecido ósseo em relação aos demais grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre os grupos das medidas obtidas pela μ CT, volume em mm^3 , superfície em mm^2

Grupo	HAAIlgGel		HA		Controle		Integra	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Volume tecido ósseo	6,71	1,59	5,63	1,94	2,06	0,71	5,36	0,12
Porcen. tecido ósseo	17,40	4,25	13,05	4,67	5,83	2,02	19,79	1,77
Superf. de contato	104,15	27,86	92,24	33,46	31,15	12,52	45,08	2,55
Densid. Superf. Óssea	15,44	0,71	16,27	0,84	14,58	2,08	8,43	0,65

Fonte: confeccionado pelo autor, a partir dos dados obtidos por μ CT.

Quando analisada a porcentagem de tecido ósseo, obtida pela razão entre o volume de tecido ósseo e o volume total, é evidenciado uma maior quantidade de tecido mineralizado no grupo calvária integra em relação aos demais grupos. O parâmetro superfície de contato ósseo que representa a área superficial do tecido mineralizado que esta interconectada, o grupo HAAIlgGel apresenta um maior valor em relação aos demais grupos. Outra variável obtida pela μ CT é a densidade de superfície óssea, sendo esta a razão entre área total da superfície do tecido mineralizado e o volume total analisado, o grupo HA apresenta, o maior valor entre os grupos.

5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

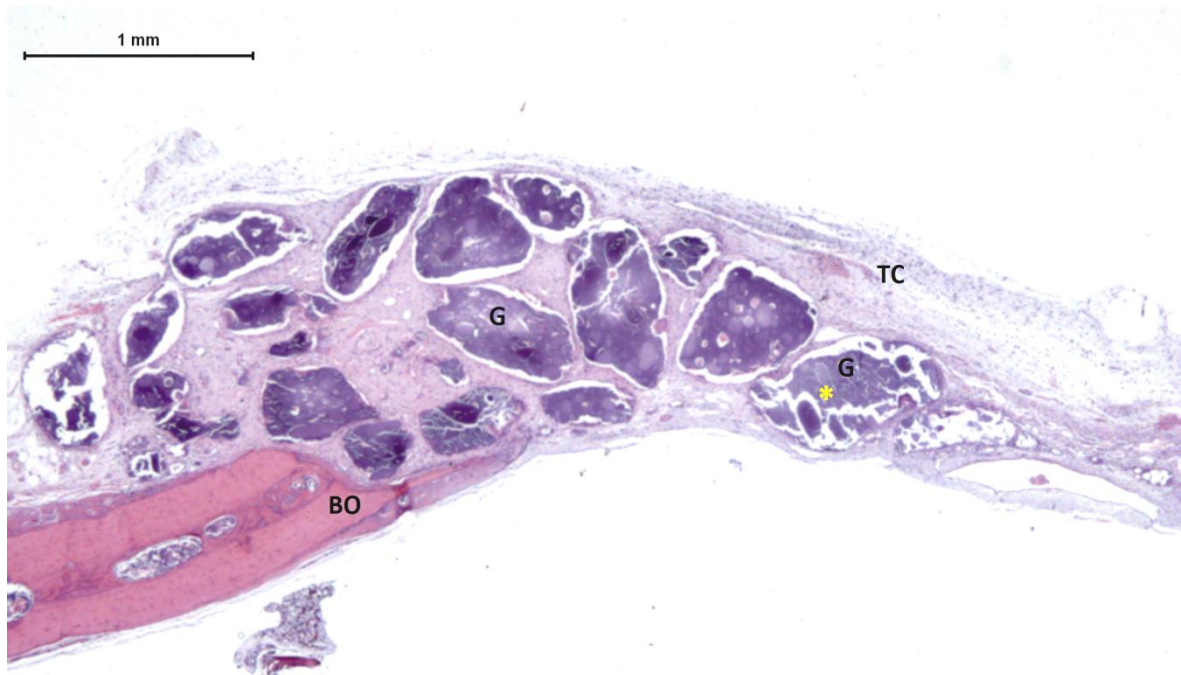
No grupo experimental HAAIlgGel, defeito crítico preenchido com biomaterial hidroxiapatica e alginato a 1% com gelatina (1%) é visto um deslocamento de biomaterial para a parte superior (área do retalho) em apenas um lado (Figura 21). É

visualizada a presença de neoformação osteóide reacional nas bordas e defeito preenchido com tecido conjuntivo frouxo exibindo edema (Figura 22). Observou-se uma proliferação de células fusiformes junto a uma reação granulomatosa circundando o biomaterial particulado com tamanhos diversos, vistos em múltiplas camadas e proliferação vascular acentuada. O biomaterial aparece multifragmentado com fibrose delgada envolvendo o mesmo (Figura 21). Notou-se a presença de uma neoformação de matriz osteóide reacional das bordas, que aparece discretamente estendida por condução, envolvendo partículas de biomateriais próximas a estas bordas.

No grupo experimental HA, defeito crítico preenchido com o biomaterial BioOss[®], observou-se que nas bordas do defeito, uma neoformação óssea reacional, discretamente ampliadas, quando há a presença do biomaterial particulado nas suas proximidades (Figuras 23 e 24). É visualizado o defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso em áreas edemaciadas com inúmeras partículas do biomaterial, de diversos tamanhos vistos em camadas (Figura 23). Nota-se a presença de edemas circundados por reação granulomatosa e fibrosa delgada, bem como acentuada proliferação vascular (Figura 24). É visto que, em torno dos biomateriais particulados de permeio, existe proliferação de células fusiformes (Figuras 24 e 25). Observa-se também uma neoformação óssea de matriz osteóide em torno de alguns materiais particulados. Nos dois grupos experimentais descritos (HA e HAAIlgGel), há em comum bordas vistas em “bisel”, neoformação óssea de matriz osteóide nas bordas e defeito preenchido com tecido conjuntivo frouxo.

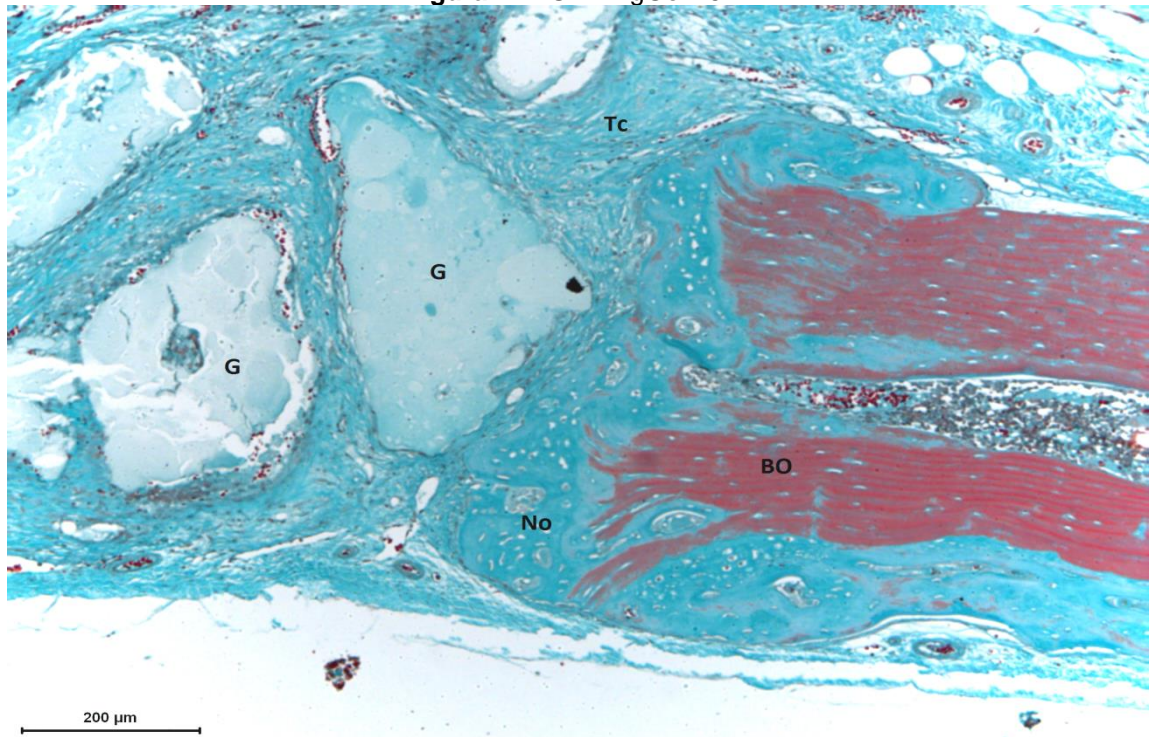
Foi observado na avaliação histomorformétrica, aos 15 dias no grupo controle, defeito crítico sem implantação de biomaterial, uma neoformação óssea restrita às bordas do defeito do tipo reacional (não estendem a outras áreas) (Figura 26). O defeito apresenta-se recoberto por um delgado tecido conjuntivo fibroso, infiltrado inflamatório mononuclear discreto próximo às bordas do defeito, acompanhados de discreta proliferação de capilares sanguíneos (Figura 27). Na calvária íntegra, observou-se uma espessura normal, osso lamelar integro com presença de medula óssea, presença de sutura intracraniana, tecido adiposo (subcutâneo), sem fratura. Osso normal (Figura 28).

Figura 21 - Sobreposição de biomaterial, HAAIlgGel 15 D



Região da borda óssea (BO), Tecido conjuntivo fibroso (Tc) em permeio aos grânulos (G) de HAAIlgGel. (*) biomaterial multifragmentado, HE. Barra 1 mm. **Fonte:** Foto do autor

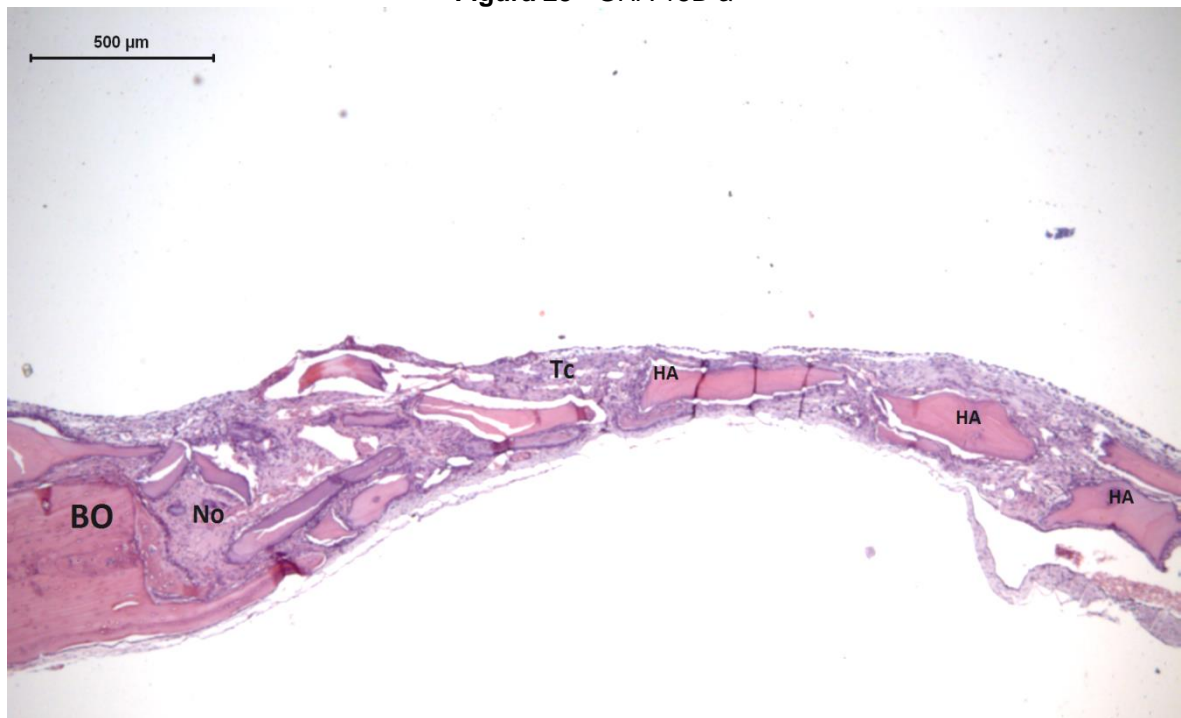
Figura 22 - GHAAIlgGel 15 D



Região da borda óssea (BO) com neoformação óssea reacional (No). Tecido conjuntivo fibroso (Tc) em permeio aos grânulos (G) de HAAIlgGel. Goldner. Barra 100 μm.

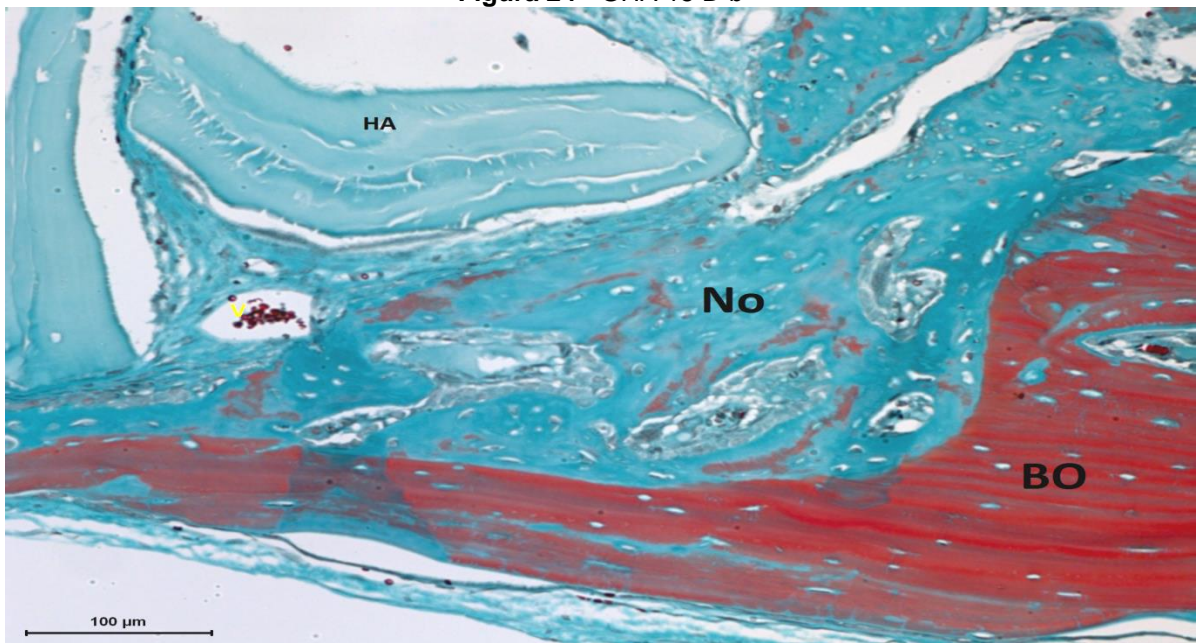
Fonte: Foto do autor

Figura 23 - GHA 15D a



Região da borda óssea (BO) com neoformação óssea reacional (No). Tecido conjuntivo (Tc) em permeio aos grânulos (G) de HA. Goldner. Barra 500 μm. **Fonte:** Foto do autor.

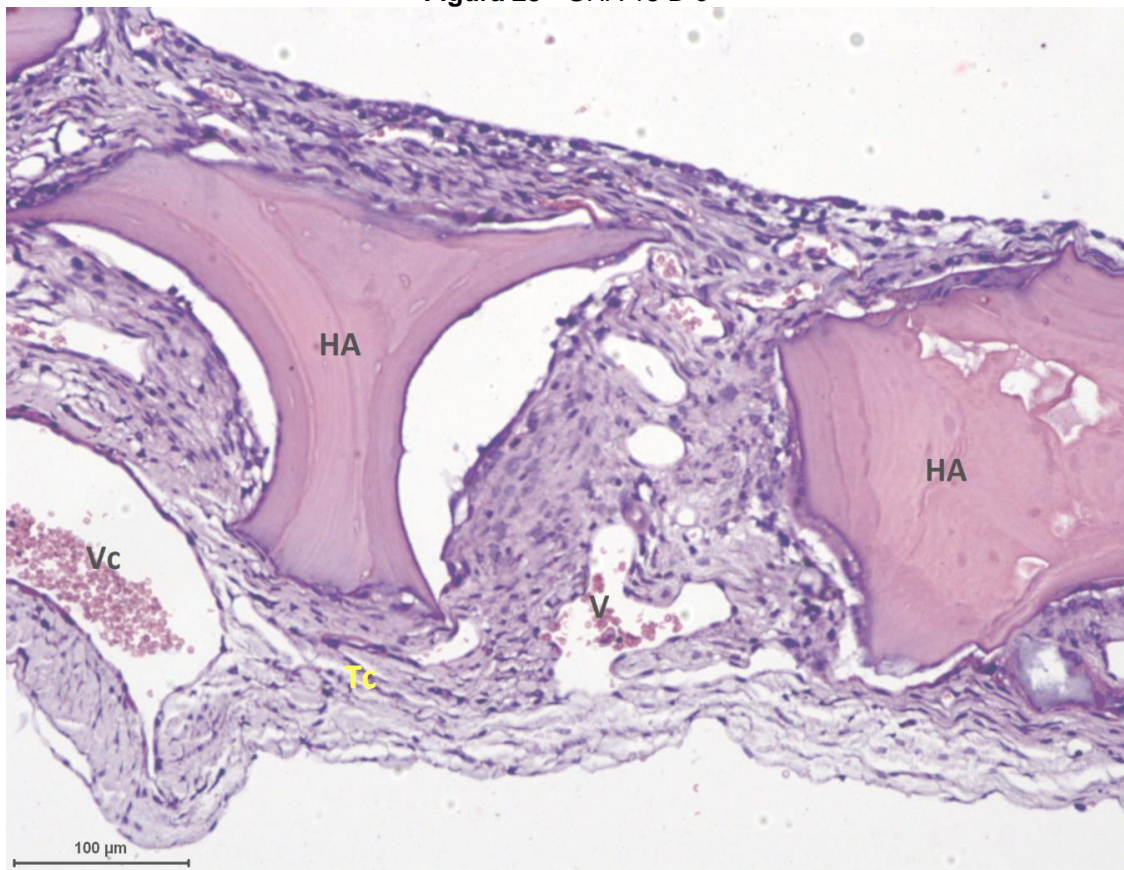
Figura 24 - GHA 15 D b



Região da borda óssea (BO) com neoformação óssea reacional (No). Vaso neoformado (V) em permeio aos grânulos (G) de HA. Goldner. Barra 100 μm.

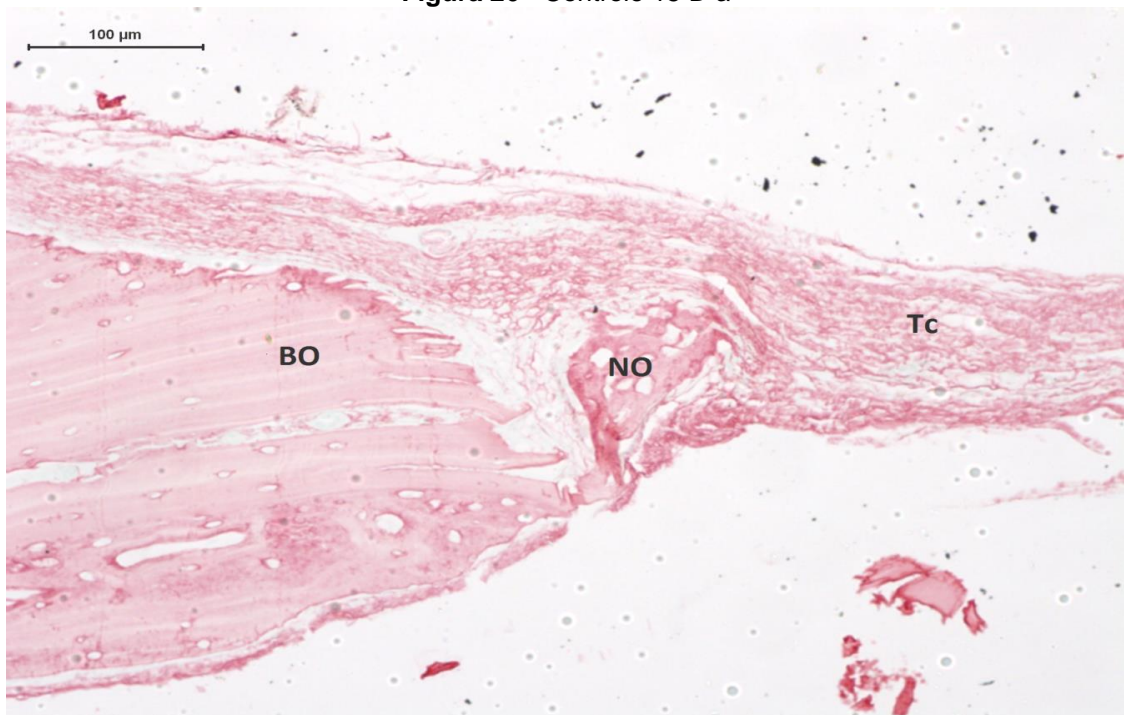
Fonte: Foto do autor

Figura 25 - GHA 15 D c



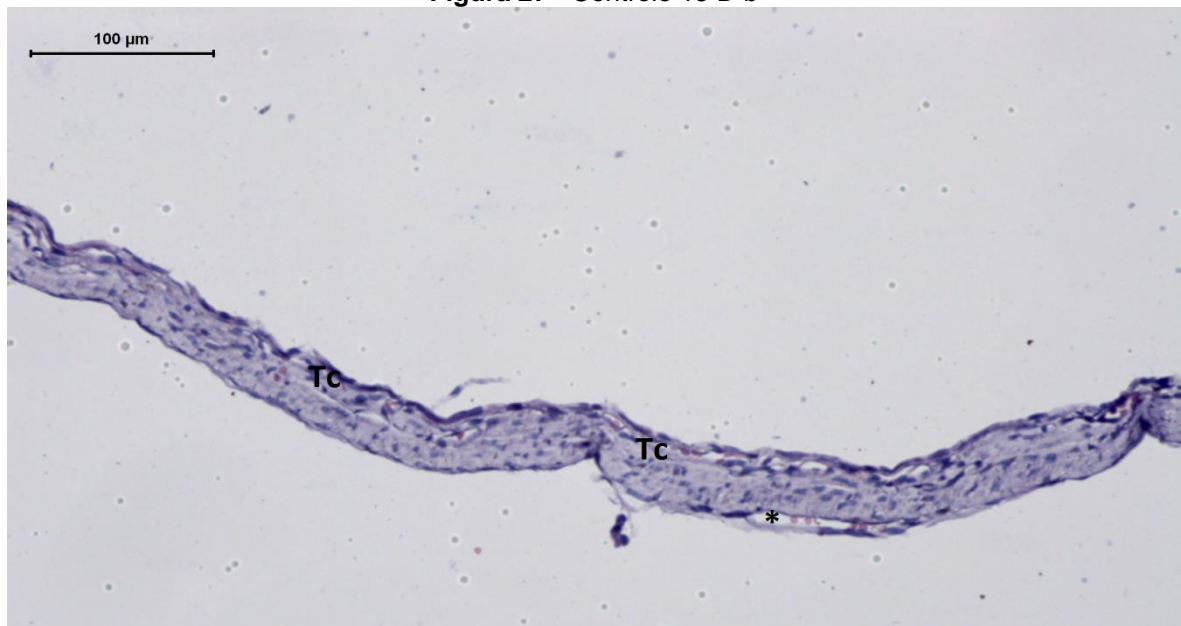
Região central do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Tc), neovascularizado (V), em permeio as partículas BioOss® (HÁ), Veia central (Vc). HE. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 26 - Controle 15 D a



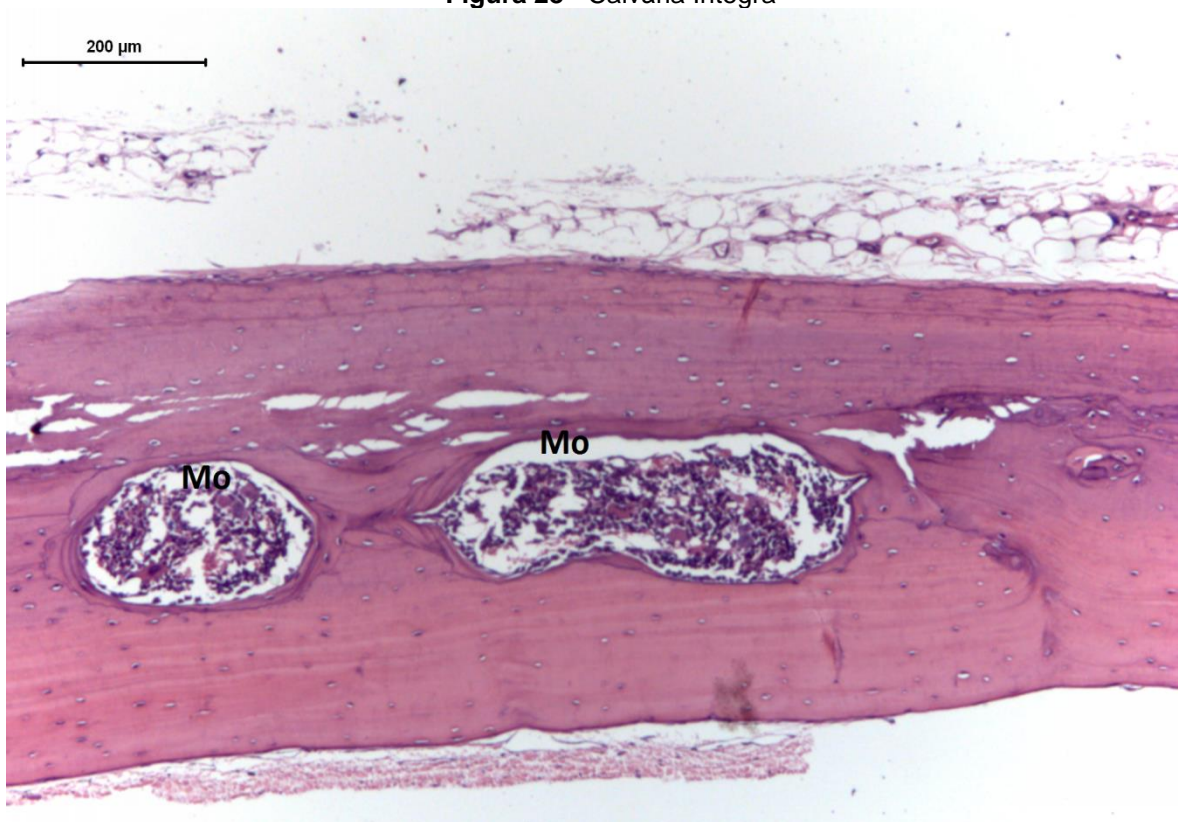
Borda óssea (BO), neof ormation óssea restrita às bordas do defeito do tipo reacional (NO), tecido conjuntivo fibroso (Tc) PIFG. Barra 100μm.

Fonte: Foto do autor

Figura 27 - Controle 15 D b

Região central do defeito, tecido conjuntivo fibroso (Tc), (*) HE. Barra 100μm.

Fonte: Foto do autor

Figura 28 - Calvária Inteira

Calvária Inteira com espessura normal, osso lamelar íntegro com presença de medula óssea (Mo).
HE. Barra 200μm.

Fonte: Foto do autor

A análise histomorfométrica demonstra que o grupo HA apresenta uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo em relação ao HAAIlgGel (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre os grupos das medidas obtidas pela histomorfometria, área em mm² quando comparados ao grupo calvária íntegra (100%)

Grupo	HAAIlgGel		BioOss		Controle		Íntegra	
medida	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Área total	7,82	1,10	6,73	3,54	1,57	1,00	4,40	0,19
Área de tecido ósseo	0,29	0,25	0,40	0,25	0,49	0,25	3,71	0,01
Área. tecido conjunt.	2,97	1,37	3,21	1,49	1,08	0,85	0,36	0,11
Área de Biom.	4,56	1,23	3,12	2,24	-	-	-	-
Percent. Área total	177,63	24,99	152,95	80,38	35,63	26,38	100,00	-
Percent. tecido ósseo	6,57	5,73	8,98	5,68	11,20	5,73	84,34	3,86
Percent. tecido conjunt.	67,53	31,05	73,01	33,84	24,43	19,34	8,19	2,27
Percent. biom.	103,52	28,03	70,96	50,87	-	-	-	-

Fonte: confeccionado pelo autor, a partir dos dados obtidos pela histomorfometria

6 DISCUSSÃO

O propósito da utilização da μ CT como método de avaliação de reparo de defeitos ósseos críticos, está em obter dados qualitativos e quantitativos do defeito, do osso neoformado e do biomaterial após implantação no defeito, através de um método não invasivo (SAUNA et al., 2008). Neste estudo ao avaliar as imagens tridimensionais obtidas pela μ CT, no grupo HAAlgGel observa-se que o biomaterial e o osso são diferentes morfologicamente, visualiza-se com nitidez a microarquitetura do biomaterial e do osso e a localização do biomaterial dentro e fora do defeito em vários planos.

Os mesmos achados são encontrados no grupo HA, com o destaque para a grande quantidade de biomaterial no centro do defeito sem promover o reparo. Tais resultados ratificam o valor da μ CT para obtenção de informações relacionadas a medições geométricas e propriedade dos biomateriais, destacado na literatura pelos autores Bart e Wallace (2013) em seus estudos.

Foi observado que no grupo HA a diferença morfológica do biomaterial para o osso é ainda mais sutil do que no grupo HAAlgGel. Tal resultado é explicado pela similaridade da hidroxiapatita com o osso, fator complicador para obtenção de imagens radiográficas (Aragón et al., 2011). Contudo ainda é possível diferenciar a morfologia do biomaterial em relação a do osso, em virtude da alta resolução de imagem oferecida pela μ CT já descrito na literatura (SALES et al., 2011; PANG, et al., 2012). Desse modo, a imagem obtida do grupo controle o defeito com contornos bem definidos e, por vezes com bordas em “bisel”. A calvária integra é vista com as suturas intracranianas com muita nitidez.

De acordo com os parâmetros morfométricos obtidos por μ CT, o grupo HAAlgGel apresenta maior volume de tecido ósseo comparado aos grupos HA e controle, o que sugere que houve uma sobreposição de biomaterial nas bordas e maior quantidade dos mesmo presente no defeito. Tal inferência é sustentada pelo que é visualizado nas imagens (figuras 8 e 10).

Outro parâmetro importante avaliado é a porcentagem de tecido ósseo presente na amostra e o grupo calvária integra possui maior valor comparado aos

outros grupos. Os resultados apresentados pelos biomateriais foram bem próximos da calvária íntegra, o que sugere ambos possuem uma boa capacidade de promover reparo ósseo. Contudo o ponto biológico de 15 dias ainda não é suficiente para definir o motivo do percentual significativo de osso nos grupos em que foi utilizado biomateriais.

A superfície de contato, correspondente a área superficial do tecido mineralizado que esta conectada, também uma variável importante, pois o contato entre os grânulos fornece um arcabouço para a promoção do reparo no defeito. O grupo HAAlgGel apresenta maiores valores em relação a todos os grupos existentes. Quanto ao parâmetro densidade superficial óssea, razão da área total da superfície do tecido mineralizado pelo volume total analisado, o BioOss[®] apresenta uma maior superfície mineralizada, tal resultado ratifica o valor do BioOss[®] como biomaterial osteocondutor, destacado na literatura por JUNIOR et al., 2012.

O estudo histológico das amostras permitiu observar no grupo HAAlgGel uma sobreposição do biomaterial, sobretudo, na borda óssea em apenas um lado e tal achado foi visualizado também na avaliação por μ CT. O corte histológico permitiu avaliar também a região preenchida pelo tecido conjuntivo, multfragmentação do compósito de hidroxiapatita com 1 % de alginato e gelatina, o que sugere uma reabsorção do biomaterial pelo organismo, e uma proliferação vascular.

A observação dos cortes histológicos do grupo HA nota-se que o BioOss[®] encontra-se particulado em processo de reabsorção, da mesma forma que o compósito (HAAlgGel). É demonstrada uma intensa proliferação celular que não pode ser visto por μ CT. Já o grupo controle é visualizado uma neoformação restrita as bordas, sendo facilmente distinta pela coloração utilizada na histologia, com a predominância de tecido conjuntivo preenchendo o defeito. A calvária íntegra avaliada na histologia correlaciona com os resultados morfológicos encontrados na μ CT, quanto à normalidade e a presença de sutura intracraniana regular.

Ao avaliar os dados histomorfométricos (Tabela 2), o grupo HAAlgGel apresenta o menor percentual de osso e um maior percentual de tecido conjuntivo em comparado ao grupo HA, o que denota uma maior promoção de reparo ósseo do BioOss[®] em relação ao compósito. O grupo controle apresenta o maior valor percentual de tecido conjuntivo, em virtude de o defeito ser preenchido apenas por

coágulo, sem o aporte de um biomaterial para promoção do reparo ósseo. Os altos valores de porcentagem de tecido ósseo no grupo controle sugere erro de medição. A calvária íntegra é composta em sua maior parte por tecido ósseo, ratificando o padrão normal neste grupo.

Os resultados morfométricos da μ CT e da técnica histológica estão correlacionados quanto a quantificação de tecido ósseo (PARK et al., 2014) e o comportamento do biomaterial no defeito ósseo crítico. A μ CT e a histologia apresentam-se como técnicas complementares para avaliar o reparo ósseo, visto que a μ CT demonstra melhor a microarquitetura óssea como um todo e a localização do biomaterial sob uma ótica 3D. A histologia fornece informações de tecido com moles, células, formação de vasos e uma diferenciação mais precisa do tecido osso neoformado e o biomaterial.

É importante ressaltar que os resultados desse estudo são obtidos no ponto biológico de 15 dias, período inicial do reparo do defeito e faz-se necessário o acompanhamento evolutivo do reparo pela μ CT e pela histologia para uma melhor avaliação dessas técnicas. Entretanto, a μ CT é uma técnica promissora, de fácil reprodução, para avaliar defeitos ósseos críticos de forma rápida e não invasiva.

7 CONCLUSÕES

- Através da aquisição de imagens por μ TC e análise histomorfológica, foi possível quantificar o reparo ósseo de defeitos críticos sem implantação de biomateriais.
- A μ TC e a análise histomorfológica identificou e quantificou o reparo ósseo de defeitos críticos, nos grupos HA e HAAIGel.
- Na distinção do biomaterial a base de osso bovino inorgânico (BioOss[®]), em relação ao osso neoformado, a μ CT apresenta-se limitada em relação à análise histomorfologica, no ponto biológico estudado.
- Na distinção do biomaterial a base de osso fosfato de cálcio (inorgânico), alginato e gelatina (orgânico), em relação ao osso neoformado, a μ CT apresenta-se limitada em relação à análise histomorfologica, no ponto biológico estudado.

REFERÊNCIAS

- AL-FOTAWEI, R. et al. **Radiological Assessment of Bioengineered Bone in a Muscle Flap for the Reconstruction of Critical-Size Mandibular Defect.**Journal.pone, v. 9, n.9, p. 1-11, 2014.
- ANAVI, Y. et al. **Bone Remodeling in Onlay Beta-Tricalcium Phosphate and Coral Grafts to Rat Calvaria Microcomputerized Tomography Analysis.** Journal of Oral Implantology, v. 32, n.4, p.379-386, 2010.
- 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.
- ARAGÓN, J. et al. **Development and Characterization of a Novel Bioresorbable and Bioactive Biomaterial Based on Polyvinyl Acetate, Calcium Carbonate and Coralline Hydroxyapatite.** Materials Research. São Carlos, SP, v. 14, p. 25-30, jun/dez, 2010.
- BARBETTA, et al. **Role of X-ray microtomography in tissue engineering.** Ann Ist Super Sanità, Roma, v.48, n.1, p.10-18, 2012.
- BART, Z. R, WALLACE, J.M. **Microcomputed Tomography Applications in Bone and Mineral Research.** Advances in Computed Tomography,v. 2013, n. 2,p. 121-127, 2013.
- BI, L et al. **Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted withbioactive glass scaffolds.** Biomed Mater Res Part A, EUA, v. 100, p.3267-3275, 2012
- BOUXSEIN, M.L. et al. **Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography.** Journal of Bone and Mineral Research, Washington DC, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.
- DAVIS GR, et al. **Quantitative high contrast X-ray microtomography for dental research.** Journal of Dentistry, 2013.
- EZIRGANL, S et al. **The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats.** Clin. Oral Impl. Res. 00. p.1-8, 2013.

FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. **Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea**, Revista Matéria, v. 15, n. 3, pp. 392-399, 2010.

GELLYNCK, K et al. **Cell cytoskeletal changes effected by static compressive stress lead to changes in the contractile properties of tissue regenerative collagen membranes**. European Cells and Materials. v. 25. p. 317-325, 2013.

GIULIANI, A. **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. Wiley Periodicals, 2013.

GÓMEZ W, et al. **A comparative study of automatic thresholding approaches for 3D x-ray microtomography of trabecular bone**. Medical Physics, v. 40, n. 9, p. 091903-1 - 091903-14, Set. 2013.

GUIMARÃES, K. B. et al. **Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair**. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. São Paulo, SP, v.77, p. 447-54, Jul/Ago, 2011.

GULDBERG, R.E. et al. **3D imaging of tissue integration with porous biomaterials**. Biomaterials, Guildford, v.29, n.28, p.3757–3761, 2008.

HUANG, H.L. et al. **Microcomputed tomography analysis of particular autogenous bone graft in sinus augmentation at 5 months: differences on bone mineral density and 3D trabecular structure**. Clin Oral Invest, v.2013, n.17, p.535–542, 2013.

JIA, F et al. **Imaging and Quantitative Assessment of Long Bone Vascularization in the Adult Rat using Microcomputed Tomography**. The Anatomical Record. Lyon, France v.293, p.215-224, 2010.

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.

JUNG, J, W et al. **Fast microtomography using bright monochromatic x-rays**. American Institute of Physics, 2012.

JUNIOR, J. S. O. et al. **Avaliação da quantidade de neo formação óssea em seios maxilares enxertados com Bio-Oss®: Uma revisão sistemática**. Revista Brasileira de Ciências Medicas e da Saúde, v.1, n.1, p. 71-8, 2010.

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, WA, v.15, n.4, 2010.

LANDIS, E. N. E KEANE, D. T. **X-ray Microtomography**. Tutorial Review. v. 61, p. 1305-1316, set 2010.

MAIA, E. S. et al, **Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura**. Rev. Bras. Cir. Plást. Belo Horizonte, v.25, p. 566-72, 2010.

MANCHENO, P. et al. **3D Assessment of Cortical Bone Porosity and Tissue Mineral Density Using High-Resolution mCT: Effects of Resolution and Threshold Method**. Journal of Bone and Mineral Research, v. 29, n. 1, p.142–150, 2014.

MELEO D. et al. **Microtomographic and morphometric characterization of a bioceramic bone substitute in dental implantology**. Ann Ist Super Sanità, v. 48, n. 1, p. 59-64, 2012.

MITRAGOTRI, S and LAHANN, J. **Physical approaches to biomaterial design**. Nature Materials. v.8, 2009.

NOGUEIRA, L.P. **3D histomorphometric quantification of trabecular bones by computed microtomography using synchrotron radiation**. Micron. v. 41, p.990-996, 2010.

NOTODIHARDJO, F. Z. et al. 2012. **Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats**. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, v. 40, n. 3, p.287–291, 2012.

OLIVEIRA, F. P. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. Salvador, v. 9, p.37-44, jan/mai, 2010.

OLIVEIRA, Luciana. **Estudo comparativo entre radiografia digitalizada e digital na avaliação de reparo de defeito ósseo crítico com biomateriais**. 2010. 105 f (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas). Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 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. USA, v.103, n.51, p.19255-19260, 2006.

PANG, E et al. **Dimensional Micro-Computed Tomography Study on Bone Regeneration with Silk Fibroin, rh-Bone Morphogenetic Protein Loaded-Silk Fibroin and Tricalcium Phosphate Coated-Silk Fibroin in Rat Calvaria Defect**. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg . v.34, n.1, p. 1-11, 2012.

PARK, Y. S. et al. **Comparison of alveolar ridge preservation methods using three-dimensional micro-computed tomographic analysis and two-dimensional histometric evaluation.** *Imaging Science in Dentistry*, v. 44, p 143-148, 2014.

RIBEIRO, Iorrana. **Estudo da implantação in vivo de biomateriais compósitos de fosfato de cálcio e polímeros.** 2013. 78 f (Mestrado em Processos Iterativos dos Órgãos e Sistemas). Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2013.

RITMAN, E. L. **Current Status of Developments and Applications of Micro-CT.** *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v.13, p.531–552, 2011.

SALES, E et al. **Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence.** *Applied Radiation and Isotopes*. p. 1272-1276, 2011.

SHAUNA et al. **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.

SHI, Z. **Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells.** *Acta Biomaterialia*, v.5, p. 338-345, 2009.

SONG, K.M et al. **Comparative study of chitosan/fibroin–hydroxyapatite and collagen.** *International Journal of Oral Science* , v. 6, p. 87–93, 2014.

UDAGAWA A. et. al. **Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration.** *Clin. Oral Impl. Res.*, v. 24, p. 787–792, 2012.

VENUGOPAL, J. **Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering.** *Phil. Trans. R. Soc. A.*, v.368, p. 2065-2081, 2010.

VERDELIS, K et al. **MicroCT Morphometry Analysis of Mouse Cancellous Bone: Intra- and Inter-system Reproducibility.** *Bone*, v. 49, n.3, p. 580–587, 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.

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.

ZHOU, H, LEE, J. **Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering.** *Acta Biomaterialia*, v. 7, p.2769-2781, 2011.