



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

**LUCIANA SOARES DE ANDRADE FREITAS OLIVEIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RADIOGRAFIA DIGITALIZADA E  
DIGITAL NA AVALIAÇÃO DE REPARO DE DEFEITO ÓSSEO  
CRÍTICO COM BIOMATERIAIS**

Salvador  
2010

**LUCIANA SOARES DE ANDRADE FREITAS OLIVEIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RADIOGRAFIA DIGITALIZADA E  
DIGITAL NA AVALIAÇÃO DE REPARO DE DEFEITO ÓSSEO  
CRÍTICO COM BIOMATERIAIS**

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

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa

Salvador  
2010

O48 Oliveira, Luciana Soares de Andrade Freitas,  
Estudo comparativo entre radiografia digitalizada e digital na avaliação  
de reparo de defeito ósseo crítico com biomateriais/ Luciana Soares de  
Andrade Freitas Oliveira. - Salvador, 2010.  
105 f. ; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos  
dos Órgãos e Sistemas, 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

1. Regeneração óssea. 2. Densidade óssea. 3. Radiografia dentária  
Digital. 4. Radiografia. 5. Durapatita. 6. Materiais biocompatíveis.  
7. Bioengenharia. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Universidade Federal da  
Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em  
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. III. Título.

CDU: 616.714:57.085

**LUCIANA SOARES DE ANDRADE FREITAS OLIVEIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RADIOGRAFIA DIGITALIZADA E  
DIGITAL NA AVALIAÇÃO DE REPARO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO  
COM BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em, \_\_\_\_\_.

Banca Examinadora

Fabiana Paim Rosa – Orientadora \_\_\_\_\_

Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil  
Universidade Federal da Bahia

Nelson Gnoatto \_\_\_\_\_

Doutor em Odontologia (Periodontia) pela Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil  
Universidade Federal da Bahia

Maria Luiza dos Anjos Pontual \_\_\_\_\_

Doutora em Radiologia Odontológica pela Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil  
Universidade Federal da Paraíba

Dedico este trabalho:

a meus pais, Maurício e Luzia, pelo grande incentivo e por me ensinarem a nunca desistir dos  
meus sonhos;

a meus pais emprestados, Salomão e Maria Ângela, pelo grande apoio e ajuda;

a Guiga, meu irmão, por ter me ensinado a arte da paciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por ter iluminado meu caminho e me dado forças nos momentos mais difíceis.

A meus pais, Maurício e Luzia, por terem me ajudado a realizar mais um sonho. Vocês são os grandes responsáveis por minhas conquistas. Amo muito vocês.

A meu irmão, Guilherme, pela companhia, pelo apoio e por ter estado sempre a meu lado.

A meus pais emprestados, Salomão e Maria Ângela, pelo apoio e incentivo.

A Vitor, pela sua amizade. Muito obrigada.

À professora Fabiana Paim, por ter me dado oportunidade em um momento tão importante. Seus ensinamentos e seu apoio foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Daniela Pita, por sua ajuda e amizade, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À professora Maria Luiza Pontual, sempre disposta a me ajudar, mesmo sem me conhecer. Sua contribuição foi muito importante para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos professores Paulo Flores e Iêda Crusoé, por terem me mostrado o lindo caminho da pesquisa. Muito obrigada pela ajuda. Gostaria de compartilhar com vocês esta conquista.

Ao professor Roberto Paulo de Araújo, idealizador e coordenador deste Programa de Pós-Graduação. Muito obrigada pela oportunidade.

À FAPESB, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Ao Doutor Alexandre Malta Rossi, à Doutora Maria Helena Leão e aos demais pesquisadores responsáveis pela confecção do biomaterial utilizado neste estudo.

Ao Laboratório Servier, pelo apoio e pelo fornecimento da medicação utilizada neste estudo.

Ao Biotério da UEFS, em especial ao técnico Júnior, pela paciência e grande ajuda durante a realização dos experimentos.

À professora Viviane Sarmiento, por ter disponibilizado o *scanner* com leitor de transparência utilizado neste estudo.

A minhas colegas de pesquisa, Ana Clara, Isabela e Marion, pela ajuda e boa convivência. Graças à nossa união e amizade, conseguimos realizar este trabalho.

Aos alunos PIBIC, Marcel, Manuel e Poliana, pois a ajuda de vocês foi muito importante. Obrigada.

A meus colegas de Pós-graduação, em especial a Thaís, por estar sempre a meu lado e pela ajuda prestada durante a pesquisa. A sua presença e o seu apoio foram fundamentais para que concluíssemos juntas mais uma etapa da nossa formação.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA.

A meus colegas da FACIMAGEM, pelo apoio e pela compreensão durante esses dois anos.

A meus familiares, em especial a meus avós, pelo grande incentivo ao estudo e à leitura. Sem o exemplo de vocês, eu não teria vencido mais essa etapa da minha vida.

A Diogo, pela disponibilidade e pelas belíssimas fotos realizadas.

A minhas amigas do Vieira, que até hoje estão a meu lado, incentivando a realização de meus sonhos. Amo muito vocês.

A minhas amigas e amigos da FOUFBA. Vocês, com certeza, fazem parte desta conquista. Muito obrigada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para mais essa conquista, muito obrigada!

De nada serviria. Não teria chegado a lugar nenhum. Não  
teria voltado. E não teria descoberto que o mais alto dos  
sonhos é feito de um punhado de pedrinhas numa sacola  
azul.

Amyr Klink, 1996

OLIVEIRA, Luciana Soares de Andrade Freitas. Estudo comparativo entre radiografia digitalizada e digital na avaliação de reparo de defeito ósseo crítico com biomateriais. 105f. il. 2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

## RESUMO

O reparo de defeitos ósseos de dimensões críticas é um grande desafio, uma vez que, nessas condições, o tecido ósseo não é capaz de se regenerar espontaneamente. Desse modo, faz-se necessário o desenvolvimento de biomateriais que sejam capazes de promover a regeneração tecidual, ao reconstruir o tecido perdido e restaurar a estabilidade mecânica e funcional, bem como de técnicas que possibilitem uma avaliação adequada desse processo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a neoformação óssea em defeito crítico, na calvária de rato preenchida com biomateriais, por meio de radiografias convencional digitalizada e digital. Foram utilizados 45 ratos *wistar*, distribuídos aleatoriamente para compor nove grupos: I e V – grupo controle; II e VI – defeito ósseo preenchido com microesferas de hidroxiapatita (HA); III e VII – defeito ósseo preenchido com selante de fibrina (Tissucol<sup>®</sup>); IV e VIII – defeito ósseo preenchido HA e selante de fibrina; IX – grupo densidade padrão ouro para análise radiográfica, no qual foi realizada uma demarcação na calvária utilizando broca cirúrgica. Os grupos V a VIII receberam 900mg/kg/dia de ranelato de estrôncio (Protos<sup>®</sup>) misturados à dieta. Após 45 dias pós-operatórios, os animais foram eutanasiados, dissecados e suas calvárias fixadas em formol tamponado. Cada espécime foi radiografado duas vezes, por método convencional e método digital (DenOptix<sup>®</sup>). As radiografias convencionais foram escaneadas e, juntamente com as digitais, foram avaliadas objetivamente pela aplicação das ferramentas de análise de imagem: média dos valores de *pixels* e subtração digital. A partir das médias dos valores de *pixels*, foram obtidos também os valores equivalentes em milímetros de alumínio (mmAl). A análise dos dados foi realizada pelo teste SMM (*Studentized Maximum Module*), definiu-se um  $p \leq 0,05$  como significante. Tanto para o sistema convencional digitalizado quanto para o digital, as maiores médias de cinza, em valores equivalentes em mmAl, foram observadas nos grupos II e VI. Entretanto, a análise por valores equivalentes em mmAl possibilitou detectar diferença significativa com todos os grupos estudados ( $p \leq 0,05$ ). Pela subtração digital, mais uma vez, observou-se que os grupos II e VI apresentaram as maiores médias. Entretanto, o sistema convencional não detectou diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ), e, no sistema digital, essa diferença foi observada ( $p \leq 0,05$ ). Conclui-se que é possível avaliar a neoformação óssea por ambos os sistemas de imagem e que o sistema digital conseguiu detectar diferenças sutis de densidade. A avaliação por valores equivalentes em mmAl foi superior às demais em detectar diferenças sutis de densidade entre os grupos.

**Palavras-chave:** Regeneração óssea. Bioengenharia. Radiografia. Radiografia dentária digital. Densidade óssea.

OLIVEIRA, Luciana Soares de Andrade Freitas. Comparative study between digitized and digital radiography of critical bone repair with biomaterials. 105pp. III. 2010. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

## ABSTRACT

Bone repair in a critical size defect is a great challenge, once the tissue cannot be spontaneously regenerated. Therefore, the development of biomaterials that promote tissue regenerations and restore mechanical and functional stability is necessary. Thus, the present study aimed to assess bone neoformation in critical size defect in rat calvaria filled with biomaterials by means of conventional and digital radiography. 45 Wistar rats were randomly divided to make nine groups: I and V – Control group; II and VI – Bone defect filled with hydroxyapatite microspheres (HA); III e VII – Bone defect filled with fibrin sealant (Tissucol<sup>®</sup>); IV and VIII – Bone defect filled with HA and fibrin sealant; IX – Group gold standard density for radiographic analysis, in which was made a bone demarcation. Groups V to VIII were given 900mg/kg/day of strontium ranelate (Protos<sup>®</sup>) which was added to the diet. 45 days after surgery, the animals were subjected to euthanasia and dissected for removal of the calvarium. The specimens were kept in buffered formaldehyde solution. Conventional and digital (DenOptix<sup>®</sup>) radiographs were taken of each specimen. The conventional radiographs were scanned and, together with the digital radiographs, were objectively evaluated using the image analysis system: average pixel gray measurement and digital subtraction. Based on the average values of gray per pixel, the equivalent values in millimeters of aluminium (mmAl) were also obtained. Statistical analysis was made using SMM (*Studentized Maximum Module*) test and a level of significance of 5% was defined. Both in the conventional and digital systems, the highest average values for gray values and the equivalent values in mmAl were found in groups II and VI. However, analysis by equivalent values in mmAl has made it possible to detect significant differences in all the studied groups ( $p \leq 0.05$ ). Digital subtraction has shown again that groups II and VI had the highest average values. However, no significant difference was found between the groups ( $p > 0.05$ ) in digitized radiographs. In contrast, such difference was found in the digital system ( $p \leq 0.05$ ). It is concluded that bone neoformation can be evaluated using both systems and that the digital system has made it possible to detect subtle density differences. The evaluation by equivalent values in mmAl has been shown to be more effective in detecting subtle density differences among the groups than the other methods.

**Keywords:** Bone regeneration. Bioengineering. Radiography. Digital dental radiography. Bone density.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Hidroxiapatita.....	45
Figura 2	Selante de fibrina (A) e ranelato de estrôncio (B).....	46
Figura 3	Preparação pré-cirúrgica dos animais: realização de anestesia intramuscular	48
Figura 4	Preparação pré-cirúrgica dos animais: tricotomia (A) e antissepsia com álcool iodado (B).....	48
Figura 5	Preparação pré-cirúrgica dos animais: montagem do campo cirúrgico e posicionamento do animal em decúbito ventral.....	49
Figura 6	Etapas cirúrgicas: incisão bicoronal cutânea (A, B), divulsão e elevação do retalho (C), remoção do periósteo (D).....	50
Figura 7	Etapas cirúrgicas: confecção do defeito ósseo com broca trefina (A, B), defeito ósseo confeccionado (C), defeito ósseo preenchido com selante de fibrina (D) e com hidroxiapatita (E), rebatimento do retalho, seguido de sutura interrompida (F).....	51
Figura 8	Preenchimento da cera utilidade com microesferas de HA, simulando uma condição clínica.....	52
Figura 9	Radiografia das microesferas de HA: A - Radiografia convencional digitalizada; B- Radiografia digital.....	53
Figura 10	Posicionador de acrílico para realização das tomadas radiográficas. A- Placa de acrílico. B – Calvária. C – Cera utilidade. D – Filme radiográfico..	54
Figura 11	Defeito ósseo demarcado por marcadores de guta-percha(setas pretas) e a escala de alumínio posicionada próximo ao espécime.....	54
Figura 12	Películas radiográficas: A – Placa de armazenamento de fósforo (DenOptix), B – Filme radiográfico <i>Insight</i> (Kodak).....	55
Figura 13	Seleção do ROI circular envolvendo o defeito ósseo.....	57
Figura 14	Seleção da função histograma.....	57
Figura 15	Seleção da função recorte (A) e a imagem recortada (B).....	58
Figura 16	Seleção do ROI retangular (A), realização das medidas em cada degrau da escala de alumínio (B) e obtenção das medidas (C).....	59
Figura 17	Análises realizadas no programa Excel para obtenção da DOL e equação matemática para transformação dos valores de <i>pixel</i> em mmAL.....	60
Figura 18	Seleção da linha de tendência.....	61

Figura 19	Seleção da ferramenta cálculo em imagens.....	62
Figura 20	Seleção da operação subtração.....	62
Figura 21	Imagem resultante da subtração digital.....	63
Figura 22	Média dos valores de <i>pixels</i> da imagem resultante, obtida pela ferramenta histograma.....	63
Figura 23	Radiografias convencionais digitalizadas exemplificando os grupos estudados.....	67
Figura 24	Radiografias digitais exemplificando os grupos estudados.....	67
Gráfico 1	Média dos valores de <i>pixels</i> obtidos pelo sistema convencional e pelo sistema digital de imagem, nos diferentes grupos estudados.....	69
Gráfico 2	Valores equivalentes em mmAl para os diferentes grupos estudados, pelos sistemas convencionais e pelo sistema digital de imagem.....	71
Gráfico 3	Média dos valores de <i>pixels</i> obtidos pelo sistema convencional e pelo sistema digital para os diferentes grupos estudados, após a subtração digital.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de animais segundo grupo e tempo biológico.....	47
Tabela 2	Quantidade de radiografias analisadas por grupo e sistema de imagem.....	66
Tabela 3	Média dos valores dos <i>pixels</i> nos defeitos ósseos no sistema convencional digitalizado e digital.....	68
Tabela 4	Valores correspondentes em mmAl nos sistemas convencional digitalizado e digital.....	70
Tabela 5	Média dos valores dos <i>pixels</i> obtidos pelo sistema convencional e pelo sistema digital para os diferentes grupos estudados, após a subtração digital.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
HA	Hidroxiapatita
hrMR	Ressonância Magnética de alta resolução
hrTC	Tomografia Computadorizada de alta resolução
mmAl	Milímetros de Alumínio
micro-RM	Ressonância Micromagnética
micro-TC	Micro-tomografia Computadorizada
PO	Padrão Ouro
RE	Ranelato de Estrôncio
ROI	Região de Interesse
SF	Selante de Fibrina
TC	Tomografia Computadorizada
TCCB	Tomografia Computadorizada <i>Cone Beam</i>
TE	Tempo de exposição
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UH	Unidades <i>Hounsfield</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	RADIOGRAFIA CONVENCIONAL, DIGITAL E DIGITALIZADA.....	20
2.2	NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....	26
2.2.1	Neoformação óssea <i>versus</i> defeito crítico.....	26
2.2.2	Substitutos ósseos.....	27
2.2.3	Métodos imaginológicos para avaliação do tecido ósseo.....	32
2.2.4	Imagens radiográficas na avaliação do reparo ósseo.....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>42</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	43
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
4.1	BIOMATERIAL.....	45
4.2	ANIMAIS.....	46
4.3	TÉCNICA CIRÚRGICA DAS LESÕES ÓSSEAS.....	48
4.4	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	51
4.4.1	Preparação dos animais.....	51
4.4.2	Preparação do corpo de prova.....	52
4.5	ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	53
4.5.1	Avaliação das imagens.....	55
4.5.2	Valor médio do <i>pixel</i> .....	56
4.5.2.1	Avaliação do defeito ósseo.....	56
4.5.2.2	Padronização pela escala de alumínio.....	58
4.5.3	Subtração digital.....	61
4.6	ANÁLISE DOS DADOS.....	64
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
5.1	VALOR MÉDIO DOS <i>PIXELS</i> .....	68

5.2	VALOR EQUIVALENTE EM MILÍMETROS DE ALUMÍNIO.....	70
5.3	SUBTRAÇÃO DIGITAL.....	72
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>105</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

A bioengenharia tecidual é uma área de atuação nas ciências biomédicas, responsável pela busca e pelo aprimoramento de novas terapias e (ou) desenvolvimento de novos biomateriais. Esses biomateriais podem ser utilizados no tratamento de lesões ósseas, particularmente naquelas com perdas teciduais excessivas ou com capacidade reparativa limitada, a exemplo dos defeitos ósseos de dimensões críticas, em que o tecido ósseo não é capaz de se regenerar espontaneamente (MARINS *et al.*, 2004).

Diversos métodos clínicos são propostos para avaliar a formação óssea em áreas de defeito ósseo. Dentre eles, podem-se citar: as biópsias, a sondagem clínica, o acesso cirúrgico e exames por imagem, como as radiografias e tomografias computadorizadas. Entretanto, cada um desses métodos possui vantagens e limitações que podem contraindicar o seu uso. O método ideal são as biópsias, pois elas possibilitam distinguir se a formação do tecido ósseo estaria relacionada ao biomaterial ou às células progenitoras presentes nas bordas do defeito (MEIJER *et al.*, 2008). Porém, para se evitarem traumas adicionais ao paciente, devem ser buscados métodos não-invasivos de avaliação da neoformação óssea. Dentre esses métodos, destacam-se os exames radiográficos.

As radiografias convencionais e digitais têm mostrado resultados satisfatórios no que tange à avaliação de pequenas alterações ósseas, pela análise do valor médio do *pixel* e pela subtração digital (ALMEIDA *et al.*, 2001; BOZZO *et al.*, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2009; DOTTO *et al.*, 2005). Mais recentemente, essa ferramenta de análise do valor médio do *pixel* tem sido aplicada com a finalidade de observar a formação óssea em modelos de defeito crítico (ZHANG *et al.*, 2010a,b).

Alguns autores desenvolveram, ainda, modelos quantitativos de avaliação radiográfica de sítios com defeitos ósseos, visando a melhorar a eficácia das avaliações e reduzir variações entre observadores (BELTRAME *et al.*, 2005; SCHÖNBERGER *et al.*, 2007; SCHÖNBERGER *et al.*, 2010). Tais métodos demonstram ser adequados, seguros, de fácil uso, além de fornecerem informações detalhadas do tecido regenerado.

Essas perdas de integridade tecidual podem ser resultantes tanto de traumas como de deformidades de desenvolvimento e de doenças (YOUNG *et al.*, 2007). Diante dessa realidade, os profissionais de saúde depararam-se com o desafio de desenvolver técnicas e materiais que promovam a regeneração tecidual e reconstruam o tecido perdido, minimizando a dor e restaurando a estabilidade mecânica e funcional (KAIGLER; MOONEY, 2001). Outra proposta foi a de desenvolver biomateriais que possam ser utilizados em cirurgias minimamente invasivas, uma vez que essa técnica exige pequenas incisões, anestesia local, induz poucas complicações, pouca morbidade pós-operatória, diferentemente de outros

métodos mais invasivos, além de estar relacionada com uma recuperação pós-operatória mais rápida (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Para que sejam utilizados com tal finalidade, os biomateriais podem ser confeccionados em formato de microesferas. Elas possuem fluidez e aplicações mais versáteis, o que permite serem injetadas como um arcabouço tridimensional em defeitos ósseos de vários tamanhos, para estimular o seu reparo (SHEN *et al.*, 2010). Uma biocerâmica que pode ser preparada com esse formato é a hidroxiapatita (HA). Ela apresenta características adequadas para ser utilizada nessas situações, dentre elas: possui estrutura química semelhante à do osso, é biocompatível e possui propriedade osteocondutiva (WAN *et al.*, 2006).

Entretanto, se a morfologia do defeito ósseo não possibilitar a estabilidade desses biomateriais em formato de microesferas, pode-se associar o uso de um selante de fibrina (CHEN *et al.*, 2009). Esse é um polímero natural que promove angiogênese, fixação e proliferação celular, o que pode criar um microambiente propício para que ocorra a regeneração tecidual (OSATHANON *et al.*, 2008).

Além disso, é possível que a administração sistêmica de algumas drogas, como o ranelato de estrôncio, atue conjuntamente nesse processo de reparo tecidual, já que esse fármaco atua no metabolismo ósseo (GEOFFROY *et al.*, 2011), ao promover uma diminuição na reabsorção óssea e um aumento na sua formação (BRUYERE *et al.*, 2007).

Desse modo, devem ser desenvolvidos, simultaneamente, biomateriais adequados à regeneração tecidual e métodos para avaliação desse processo. A radiografia, por ser um método não-invasivo, de fácil acesso e baixo custo, deve ser testada nesse contexto.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 RADIOGRAFIA CONVENCIONAL, DIGITAL E DIGITALIZADA

Desde a descoberta da radiação X por Roentgen em 1895 (WEBER, 2001; WHITE; PHAROAH, 2008), os exames radiográficos tornaram-se cada vez mais presentes na prática médica, juntamente com o desenvolvimento de técnicas e práticas seguras, o que contribuiu para que eles se tornassem os principais métodos complementares no diagnóstico de alterações no tecido ósseo e de patologias.

Ainda no século XIX, os primeiros receptores de imagem utilizados eram placas de vidro. Porém, por serem caras, pesadas e de difícil manipulação (WEBER, 2001), foram sendo substituídas por filmes fotográficos (RUPRECHT, 2008). Esses filmes eram feitos a partir de acetato de celulose (WEBER, 2001), e a imagem produzida era em negativo, ou seja, estruturas densas, como o osso, apareciam radiolúcidas na imagem final, enquanto o tecido mole era radiopaco. Em 1913, a Eastman Kodak introduziu no mercado o primeiro filme radiográfico com finalidades odontológicas, e, em 1919, foi lançado um filme radiográfico para exposição direta à radiação X (RUPRECHT, 2008).

Na época da descoberta da radiação X e nas décadas subsequentes, pouco se conhecia sobre os seus efeitos deletérios. Desse modo, as primeiras radiografias foram realizadas com tempos de exposição muito altos (WEBER, 2001). Ainda em 1896, foi realizada a radiografia do crânio de um voluntário, que foi irradiado por uma hora, e, cerca de três semanas depois, ele começou a desenvolver um quadro epilético (GIBBS, 1996). Muitos cientistas ficaram mutilados, desenvolveram dermatites e tumores em decorrência das altas doses de radiação (WEBER, 2001). Houve, então, a necessidade de se desenvolverem métodos de radioproteção, assim como receptores de imagem mais sensíveis à radiação, em que a imagem final fosse satisfatória e a dose de radiação recebida fosse menor.

Os primeiros aparelhos de radiação X utilizavam tubos de gás como fonte de elétrons, porém não permitiam uma padronização das exposições, nem um ajuste na quantidade de raios X produzidos, assim como exigia potentes bobinas de indução alimentadas por corrente contínua. Em 1913, Willian Coolidge desenvolveu os Tubos Coolidge, utilizando o tungstênio maleável, no qual a fonte de elétrons era renovável e controlável (RUPRECHT, 2008). Os Tubos Coolidge são utilizados nas ampolas de aparelhos de radiação X até os dias atuais.

O século 20 foi, assim, um período de grandes transformações. Diversos aparelhos de radiação X e filmes foram lançados, e no ano 2000, a Eastman Kodak introduziu o filme radiográfico E/F-speed, o qual necessita de uma dose de radiação cerca de 1/60 daquela

necessária em 1919 (RUPRECHT, 2008). Esse permanece sendo o filme mais sensível disponível no mercado, se o processamento químico for realizado em uma processadora automática.

Desse modo, a radiografia convencional foi por muito tempo o único método disponível para obtenção de imagens dos tecidos duros. Essa técnica consiste na utilização de filmes radiográficos sensibilizados pela radiação X, que necessitam de uma etapa de revelação química para obtenção da imagem radiograficamente visível (WHITE; PHAROAH, 2007). Existem dois métodos principais para a realização do processamento químico das imagens. O primeiro requer uma câmara escura com tanques de processamento, sendo necessário um amplo espaço para tal. O outro pode ser realizado em processadoras automáticas, que possuem a vantagem de reduzir o tempo de trabalho, por processar as imagens mais rapidamente.

Nas diversas especialidades médicas e odontológicas, a radiografia convencional possui ampla indicação, por ser um método não-invasivo e com alto poder de diagnóstico, que permite detectar diversas alterações nos tecidos ósseos. Quando corretamente obtida e com adequado processamento, produz imagens de ótima qualidade. Em Odontologia, é utilizada na avaliação da estrutura interna do dente e do osso de suporte, das perdas ósseas alveolares associadas à doença periodontal, e diversas outras condições, inclusive a neoformação óssea em casos de defeitos críticos provocados por traumas, acidentes e doenças no complexo orofacial (WHITE; PHAROAH, 2008).

A radiografia possui ainda um inestimável valor legal. Ela deve ser adequadamente obtida e deve ser armazenada em condições ideais, para que, se necessário, seja utilizada como matéria de prova em processos jurídicos (FALCÃO; SARMENTO; RUBIRA, 2003), uma vez que constitui o meio de prova para a comprovação da qualidade dos tratamentos realizados. Para isso, é fundamental que sejam processadas, rotuladas, identificadas e arquivadas corretamente (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Entretanto, entre as suas principais limitações, podem-se apontar: o custo do filme, das soluções e dos equipamentos de processamento, e da câmara escura; o tempo despendido durante o processamento químico da imagem; a toxicidade dos líquidos de processamento (FARMAN, 2003); a alta dose de radiação requerida, quando comparada ao sistema digital; a variabilidade na qualidade da imagem obtida; e a possibilidade de deterioração da imagem ao longo do tempo (VAN DER STELT, 2008; WHITE; PHAROAH, 2008).

No intuito de contornar essas limitações, além de melhorar a interpretação das imagens, promover uma redução na dose de exposição ao paciente e facilitar a obtenção das

imagens, com uma conseqüente diminuição do tempo de trabalho (BOZZO *et al.*, 2004), desenvolveu-se na França, em meados de 1980, a radiografia digital (FARMAN, 2003; FREITAS *et al.*, 2006). Porém, apenas no final de 1990, ela começou a ser comercializada nos EUA (FARMAN, 2003).

O primeiro sistema desenvolvido utilizava um *chip* de câmara de vídeo associado a um cintilador (componente presente nos *chassis* para radiografias extraorais), no intuito de obter imagens instantaneamente. Esse sistema ficou conhecido como *Charge-Coupled Device* (CCD) ou sistema digital direto (FARMAN, 2003).

Como as imagens são obtidas instantaneamente, elimina-se a etapa de processamento químico, tornando o processo de obtenção da imagem mais rápido, além do reaproveitamento de seus sensores, o que permite várias reutilizações e possibilita o arquivamento digital das imagens. Entretanto, seus sensores normalmente são rígidos, possuem uma superfície ativa com dimensões pequenas, quando comparados com o filme convencional, além de ser incômodo o seu posicionamento na boca do paciente, devido ao cabo que conecta o sensor ao computador (ALMEIDA *et al.*, 2003; WHITE; PHAROAH, 2008). A dificuldade no seu posicionamento está relacionada, ainda, com uma maior probabilidade de repetições de radiografias (FARRIER *et al.*, 2009). Como seus sensores são reutilizáveis, deve-se ter um grande controle de infecção durante o uso.

Ainda nos anos 90, foi lançado no mercado o sistema digital semi-direto, que utiliza placas de armazenamento de fósforo fotoestimuladas para capturar a imagem. Esse sistema, inicialmente, possui um formato analógico; porém, quando a placa de armazenamento de fósforo for processada por um *scanner*, será convertida para um formato digital e, dessa forma, a imagem será projetada diretamente na tela do computador (PARKS; WILLIAMSON, 2002). Suas limitações estão relacionadas ao custo do equipamento e das placas de armazenamento de fósforo, à necessidade de um rigoroso controle de infecção, uma vez, que as mesmas serão reutilizadas em diversos pacientes e ao fato de que alguns sistemas não apagam a imagem após a leitura pelo *scanner*, havendo a necessidade de uma etapa de “apagamento” da imagem, o que aumenta o tempo de trabalho (MELO *et al.*, 2010). Além disso, o uso inapropriado das ferramentas de manipulação de imagem pode levar a uma degradação na imagem e, conseqüentemente, a uma interpretação errônea (WHITE; PHAROAH, 2008). Existe, ainda, a possibilidade de o sistema adquirido tornar-se obsoleto pelo desenvolvimento de novas tecnologias.

Diversos sistemas de placas de armazenamento de fósforo estão disponíveis comercialmente, dentre os quais podem-se citar o DenOptix (Dentsply/Gendex, Chicago, IL,

EUA), o Digora (Soredex, Helsinki, Finlândia), CD-Dent (DigiDent Digital Imaging Technologies, Nesher, Israel) e o Vistascan (Dürr Dental GmbH, Bissingen, Alemanha). Estes sistemas permitem a obtenção de imagens radiográficas com potencial de diagnóstico com um tempo de exposição menor do que o requerido pelos filmes convencionais, porém maior do que o exigido para o sistema CCD (FARRIER *et al.*, 2009).

Ao reduzir o tempo de exposição em 25% da dose necessária para a realização de um filme convencional, Hintze, Wenzel e Frydenberg (2002) observaram que tanto o Digora, quanto o DenOptix mostraram-se equivalentes ao primeiro em relação à acurácia de diagnóstico. Porém, ao reduzir ainda mais o tempo de exposição, o Digora e o filme convencional apresentaram resultados superiores ao DenOptix. Resultado similar foi observado por Syropoulos e colaboradores (2000), os quais afirmaram que a acurácia do diagnóstico dos sistemas digitais é comparável à do filme convencional. Já Berkhout e colaboradores (2004) mostraram que radiografias digitais, dentre elas o DenOptix, quando classificadas como aceitáveis para o diagnóstico, necessitavam de uma menor dose de radiação do que os filmes convencionais. Já foi mostrado, também, que esse sistema apresentou uma melhor qualidade de imagem, quando radiografias foram avaliadas subjetivamente (KITAGAWA *et al.*, 2000).

Dessa forma, o filme convencional e os sistemas digitais podem fornecer informações diagnósticas equivalentes e, assim, a opção por um sistema ou outro estará relacionada com as diferenças entre suas vantagens. Alguns autores afirmaram que, na visualização de lesões ósseas, a radiografia digital oferece informações tão boas quanto as da radiografia convencional, com a vantagem de possuir ferramentas que contribuem na visualização, mensuração e delimitação dessas lesões (MARTINS *et al.*, 2005). Dentre outras vantagens, o baixo contraste do sistema digital permite avaliar nuanças de cinza mais facilmente, devido a uma escala dinâmica, maior quando comparada com a do filme periapical convencional, já que a placa de armazenamento de fósforo possui uma maior eficiência na detecção dos fótons de raios X (ALMEIDA *et al.*, 2001; BÓSCOLO *et al.*, 2001).

O sistema digital possui diversas ferramentas de manipulação da imagem que podem facilitar o diagnóstico de lesões, dentre as quais se destacam: alteração de relevo, brilho e contraste, inversão de tons de cinza, aplicação de cores, análise de densidade, além da subtração digital (CHILVARQUER *et al.*, 2006). Essas ferramentas também poderão ser aplicadas na radiografia convencional, mas, para isso, é necessário que essa imagem seja convertida para um formato digital por um *scanner* com leitor de transparência ou câmaras digitais (GOGA; CHANDLER; LOVE, 2004), além de um *software* adequado, sendo, por

isso, considerada como um sistema digital indireto. Esse processo, porém, pode levar à perda ou alteração de informações (PARKS; WILLIAMSON, 2002), pela formação de ruído na imagem.

Ao comparar o diagnóstico de pequenas alterações periapicais por radiografias convencionais e digitalizadas, Nicopoulou-Karayianni e colaboradores (2002) observaram uma maior concordância entre avaliadores nas imagens digitalizadas. Esse fato está relacionado à facilidade de avaliação, garantida pelas ferramentas disponíveis e, principalmente, pela limitação do olho humano, o qual só consegue distinguir 25 tons de cinza, enquanto o computador consegue diferenciar 256 tons (CARVALHO *et al.*, 2009). Bóscolo e colaboradores (2001) acrescentaram que a digitalização de radiografias de baixa densidade é válida, uma vez que as deixa em melhores condições de se proceder ao diagnóstico.

A análise de densidade óssea é uma ferramenta que possibilita o acompanhamento de casos cirúrgicos como um método de preservação, podendo ainda ter um papel preventivo no diagnóstico de intercorrências (BOZZO *et al.*, 2004). Essa análise mede o valor médio do tom de cinza dos *pixels* (menor unidade de informação da imagem) de determinada região. Carneiro e colaboradores (2009), ao avaliarem procedimentos de remineralização em lesões pequenas de cárie restritas ao esmalte, observaram que o valor médio do tom de cinza é uma ferramenta complementar na análise do monitoramento de tratamentos de remineralização. Os valores dos tons de cinza podem variar de zero (preto total) a 255 (branco), e valores médios de *pixel* próximos a 255 demonstram que houve remineralização ou formação de tecido mineralizado, enquanto valores próximos a zero representam perda de mineral. Dessa forma, é possível avaliar o resultado de tratamentos.

Desse modo, essa ferramenta foi utilizada em diversos estudos que visaram a avaliar também a densidade óssea radiográfica. Normalmente, tais estudos envolvem ratos com alterações metabólicas induzidas, como, por exemplo, animais ovariectomizados para simular uma condição osteopenica (MORAES *et al.*, 2008; SAKAKURA *et al.*, 2006), submetidos a situações de estresse (MORAES *et al.*, 2005), ou sob efeito de medicações anti-inflamatórias (MARTINS *et al.*, 2005), visando a avaliar a influência desses procedimentos no reparo de defeitos ósseos. Essa ferramenta também já foi utilizada no acompanhamento de reparo de fraturas (BOZZO *et al.*, 2004). Os resultados desses estudos demonstram a sua aplicabilidade clínica (BOZZO *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2005), assim como sua viabilidade, já que os valores de densidade obtidos por ela são similares aos resultados observados no exame histopatológico, considerado como o padrão-ouro (TABA-JÚNIOR *et al.*, 2003).

Para facilitar essa análise, ela pode ser associada à subtração digital, que possibilita visualizar pequenas alterações entre duas imagens subsequentes, de difícil visualização por outros métodos, devido à sobreposição de estruturas anatômicas ou por diferenças de densidade indistinguíveis pelo olho humano (VAN DER STELT, 2008). Assim, é possível detectar mudanças em torno de 5% da massa mineral óssea por unidade de volume, enquanto que, nas radiografias convencionais, apenas alterações de 30% são detectadas (CHILVARQUER *et al.*, 2006). Essa ferramenta permitiria avaliar ainda pequenas alterações no osso alveolar (ALMEIDA *et al.*, 2001; HILDEBOLT *et al.*, 2009), além de possibilitar a detecção de neoformações ósseas em defeitos críticos, já que é considerada uma ferramenta de pesquisa sensível para todos os estudos relacionados a perda ou ganho de estruturas minerais em ossos (DOTTO *et al.*, 2005).

Na avaliação de reabsorções radiculares iniciais simuladas *in vitro* por meio da subtração digital, Eraso e colaboradores (2007) concluíram que essa ferramenta é sensível para avaliar reabsorções sutis do ápice radicular e que é um método confiável para avaliar alterações de densidade ao longo do tempo. Já Carvalho e colaboradores (2009) acrescentaram que é um método seguro para realizar o diagnóstico de pequenas alterações periapicais em um curto intervalo de tempo.

Para garantir a sua viabilidade, alguns pré-requisitos devem ser cumpridos, dentre os quais a padronização das radiografias pelo uso de posicionadores e a realização de radiografias sequenciais com mesmo contraste e densidade (CARNEIRO *et al.*, 2009; NICOPOULOU-KARAYIANNI *et al.*, 2002), já que é uma técnica baseada no número de *pixels* presentes na imagem radiográfica (CARVALHO *et al.*, 2009). Ela é, assim, muito sensível à variação entre observadores, como foi destacado por Bittar-Cortez e colaboradores (2006), e, por isso, todas as medidas de padronização devem ser bem realizadas e, de preferência, apenas um avaliador deve realizá-las.

Em um estudo de acompanhamento de defeitos ósseos tratados por regeneração tecidual guiada, Danesh-Meyer, Chen e Rams (2002) compararam medidas de nível de inserção clínica com radiografias digitalizadas, aplicando a subtração digital. Observou-se uma boa concordância entre os métodos, porém a subtração digital só detectou mudanças no nível de inserção a partir de dois milímetros, fato que pode estar relacionado a uma não-padronização na obtenção das radiografias.

Devido à sua grande aplicabilidade, alguns estudos foram realizados no intuito de descobrir se existiam diferenças na acurácia, quando a subtração digital era realizada por diferentes sistemas radiográficos (convencionais, digitais e digitalizados). Haiter-Neto e

colaboradores (2005) observaram que, em relação à acurácia de diagnóstico, as radiografias digitais foram superiores às digitalizadas. Porém as imagens subtraídas a partir desses sistemas apresentaram um potencial de diagnóstico semelhante. Esses resultados revelam concordância com os achados de Ferreira e colaboradores (2006), que acrescentaram ser o ruído um fator que interfere na qualidade de imagem. Por estar presente nas radiografias digitalizadas, ele é, provavelmente, o responsável pela inferioridade desse método, quando comparado às radiografias digitais.

Desse modo, percebe-se que ambos os sistemas, convencional e digital, fornecem informações diagnósticas adequadas, desde que cumpram os requisitos de reprodução fiel do objeto de interesse, já que a qualidade da imagem constitui um elemento de fundamental importância para o radiodiagnóstico (ALMEIDA *et al.*, 2000).

## 2.2 NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

### 2.2.1 Neoformação óssea *versus* defeito crítico

O osso é um tecido conjuntivo especializado e metabolicamente ativo, e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (SILVA *et al.*, 2007). Para isso, é necessária a ação de algumas células, dentre elas os osteoblastos e os osteócitos, de origem mesenquimal, e os osteoclastos, de origem hematopoiética (RAISZ, 1999).

Os osteoblastos são células responsáveis pela produção da matriz óssea (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006), bem como pela sua mineralização (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006), enquanto os osteócitos são células mecano-sensoriais, responsáveis pela sinalização para iniciar a formação e remodelação desse tecido (DEAN *et al.*, 2009). Desse modo, a sua principal função é a de controlar esse fenômeno (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006). Já os osteoclastos são os responsáveis pela reabsorção óssea (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006). Assim, a interação entre a ação osteoblástica e osteoclástica é responsável pela remodelação óssea, sendo esse processo firmemente controlado pelo sistema imunológico (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Já a regeneração óssea é um termo aplicado ao processo biológico em que a estrutura e a função do tecido lesado ou perdido são completamente restauradas (MORAES *et al.*, 2005). Esse processo é o resultado da ação contínua de fatores de crescimento e citocinas, que atuam promovendo o início da regeneração e regulando-a (KNESER *et al.*, 2006), assim como da ação de vasos sanguíneos, de células e da matriz extracelular (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006).

Na primeira etapa desse processo, ocorre uma inflamação aguda local (GOMES, 2004), com a formação de um hematoma com células vermelhas do sangue, plaquetas e fibrina (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006). Os osteócitos próximos ao sítio lesionado morrem e, conseqüentemente, ocorre uma necrose óssea local (HING, 2004). Interleucinas e fatores de crescimento serão liberados para recrutar linfócitos, macrófagos, precursores de osteoclastos e células-tronco. Esses sinais moleculares promovem também a diferenciação das células progenitoras em células endoteliais, fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, que criam um tecido fibrovascular destinado a substituir o coágulo inicial (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006). Em seguida, um processo controlado de aposição e reabsorção óssea levará à reconstituição desse tecido.

Desse modo, a consolidação do reparo no tecido ósseo está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado. Em regiões em que a morfologia e a dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo espontâneo torna-se limitado e, dessa forma, há formação de cicatriz fibrosa (KIM *et al.*, 2006).

Diversas são as situações clínicas, médicas e odontológicas, onde se buscam alternativas para promover a reparação do tecido ósseo lesado em dimensões críticas, como por traumas, ressecção de tumores, fraturas ósseas e malformação congênita (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

### **2.2.2 Substitutos ósseos**

Diversos são os substitutos ósseos disponíveis e, independentemente da natureza do defeito ósseo, o osso autólogo é o enxerto mais eficiente, já que possui propriedades

osteointegrativa, osteocondutora, além de promover a osteogênese (PRECHEUR, 2007). Entretanto, possui limitações relacionadas à disponibilidade limitada e à morbidade do sítio doador (INTINI *et al.*, 2008; LEGEROS, 2002; MARINS *et al.*, 2004). Existem, ainda, os enxertos homogêneos, que apresentam alto custo e disponibilidade limitada, associados ao risco de transmissão viral entre pacientes (LEGEROS, 2002; MARINS *et al.*, 2004). Já os enxertos heterólogos são aqueles provenientes de outra espécie animal. Eles possuem estabilidade biomecânica e elasticidade, porém não são osteogênicos (KNESER *et al.*, 2006) e existe a possibilidade de transmissão de doenças entre espécies (PRECHEUR, 2007), existindo, por isso, proposta de sua substituição por outros materiais.

Os biomateriais são compostos de natureza sintética ou natural, que serão utilizados por um período de tempo, no intuito de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, tecidos ou órgãos perdidos (CAMPOS *et al.*, 2005; NAGEM FILHO *et al.*, 2006). Desse modo, podem ser aplicados como uma alternativa aos enxertos ósseos, com eficácia comprovada em restabelecer o tecido ósseo perdido, já que podem ser facilmente dissolvidos e absorvidos enquanto os procedimentos de crescimento ósseo ocorrem. Eles devem possuir ainda propriedades físico-químicas adequadas, biocompatibilidade e osteogenicidade para promover a formação de novo osso (CHEN *et al.*, 2009; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006), além de proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007).

A bioengenharia tecidual com o uso de biomateriais, desse modo, visa a desenvolver substitutos teciduais com uma estrutura tridimensional que sirva de suporte físico-estrutural e que atue na fisiologia celular, estimulando sua migração e diferenciação (LIU; HAN; CZERNUSKA, 2009). Dentre os diversos tipos de biomateriais, a HA é umas das principais cerâmicas usadas em aplicações clínicas visando à regeneração óssea. Ela apresenta adequada biocompatibilidade e bioatividade, além de possuir propriedade osteocondutiva. Radiograficamente, apresenta-se radiopaca, característica que permite a sua identificação na imagem, assim como o acompanhamento de seu processo de degradação à medida que ocorre a neoformação óssea (WANG *et al.*, 2003).

Outra propriedade importante é o tempo de degradação da HA *in vivo*, já que esse processo deve ser proporcional à formação do novo tecido e está relacionado com a sua composição e porosidade (PRECHEUR, 2007). Desse modo, um tempo de degradação muito rápido ou muito lento pode impedir a regeneração adequada do osso (PARK *et al.*, 2009). Braye e colaboradores (1996) observaram que esse tempo é maior nas HA de origem natural do que nas sintéticas. Já Wenisch e colaboradores (2003) afirmaram que as HA sintéticas são

reabsorvidas por osteoclastos e que, após seis semanas da implantação, esse processo já é observado.

As características de superfície do material – como sua rugosidade, seu tamanho e sua porosidade, assim como sua propriedade química de composição de fase – estão relacionadas com a sua capacidade de reabsorção. O método de sinterização utilizado poderá alterar essas características, permitindo produzir HA com taxas de reabsorção mais adequadas (BROWN *et al.*, 2010).

A sinterização é o tratamento térmico aplicado às partículas de HA que irá promover a sua aglutinação (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000). Esse processo ocorre em altas temperaturas (LEGEROS, 2002) e leva a uma redução na razão área de superfície / volume da amostra (FINOLI *et al.*, 2010), além de um aumento na fase cristalina e das propriedades mecânicas (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000).

No processo de sinterização, a HA pode sofrer modificações químicas, transformando-se em  $\alpha$  – tricálcio fosfato ou  $\beta$  – tricálcio fosfato (BEHNAMGHADER *et al.*, 2008). A HA é considerada uma fase estável, sujeita a pouca reabsorção, enquanto o tricálcio fosfato é uma fase reabsorvível, e sua forma estequiométrica  $\alpha$  é ainda mais reabsorvível, o que a torna indesejada como produto final. A degradação da HA está relacionada com a temperatura e o programa de sinterização, pois se espera formar uma fase reabsorvível de  $\beta$  - tricálcio fosfato (BROWN *et al.*, 2010). Entretanto, um aumento na sua porosidade leva a uma diminuição da sua resistência à compressão e aumenta sua taxa de reabsorção (DELLINGER; WOJTOWICZ; JAMISON, 2006).

O tamanho dos poros da partícula cerâmica é inversamente proporcional ao aumento de temperatura de sinterização. Desse modo, quanto mais elevada a temperatura, menor o número de poros (BROWN *et al.*, 2010; MUNAR *et al.*, 2006). Porém sua capacidade de resistência à compressão até uma temperatura de 1.525°C possui uma relação direta com essa temperatura. Entretanto, após atingir esse patamar, a relação torna-se inversa (MUNAR *et al.*, 2006). Desse modo, um controle adequado de tal processo deve ser realizado, pois temperaturas além da necessária podem levar a uma alteração das propriedades de superfície, assim como a mudanças químicas de fase, que podem ser indesejáveis (BROWN *et al.*, 2010).

Independentemente da sua origem (natural ou sintética), a composição química da HA é similar à fase mineral dos tecidos calcificados e pode ser sintetizada com relativa facilidade em laboratório, podendo ter diversas formas de apresentação, dentre elas, em microesferas (DOURADO, 2006).

As características dos biomateriais estão intimamente relacionadas ao seu formato. Dessa forma, as partículas esféricas são mais versáteis (WANG *et al.*, 2003) e, por isso, conseguem se adaptar melhor a sítios irregulares de implantação. Além disso, a homogeneidade de sua forma de apresentação está diretamente relacionada à previsibilidade de um preenchimento adequado (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006).

O tamanho das microesferas é um fator importante para a sua atividade celular. Por isso, é necessário que possuam um tamanho uniforme na ordem nanométrica, sejam finas, apresentem homogeneidade de fase e um grau reduzido de aglomeração de partículas (FERRAZ *et al.*, 2007).

Elas podem ainda ser aplicadas por técnicas injetáveis, o que torna o ato cirúrgico minimamente invasivo. É possível, também, adicionar proteínas e fatores de crescimento à sua composição, no intuito de potencializar a formação óssea no sítio de implantação (SUN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003), assim como adicionar fármacos à sua composição para atuar como um sistema controlado para liberação de drogas (FERRAZ *et al.*, 2007).

Alguns metais podem ser adicionados à sua estrutura, dentre eles, o estrôncio. Esse mineral também pode ser administrado de forma sistêmica, visando a contribuir no processo de regeneração óssea. Ele pode ser encontrado tanto na água, como nos alimentos, estando presente também no esqueleto humano, já que possui grande afinidade com o osso (SILASNA *et al.*, 2007; VERBERCKMOES *et al.*, 2004).

O ranelato de estrôncio é uma droga que atua no metabolismo ósseo (GEOFFROY *et al.*, 2011) e, por isso, está indicado no tratamento da osteoporose, já que promove uma diminuição na reabsorção e um aumento na formação óssea, o que reduz o risco de fraturas em mulheres na pós-menopausa (BRUYERE *et al.*, 2007). Essa ação leva a um aumento da massa óssea em ratos (AMMANN *et al.*, 2004).

A ação do estrôncio sobre o metabolismo ósseo é dose-dependente. Desse modo, baixas doses estimulam a formação óssea, por uma ação mediada por células, atuando no nível de células progenitoras. Já em altas concentrações, leva a uma mineralização deficiente, devido a uma interferência na diferenciação osteoblástica (VERBERCKMOES; DE BROE; D'HAESE, 2003) e por um efeito físico-químico sobre a HA presente no osso, o que leva a uma diminuição do tamanho do cristal, *in vitro* (VERBERCKMOES *et al.*, 2004).

Outros estudos *in vitro* mostraram ainda que o papel do ranelato de estrôncio está relacionado com uma atividade anabólica e antirreabsortiva, o que leva a um aumento na diferenciação de pré-osteoblastos e na formação de nódulos ósseos mineralizados. Além de inibir a diferenciação de osteoclastos, o que pode estar relacionado à desorganização do

citoesqueleto de actina, reduzindo a sua função reabsortiva (BONNELYE *et al.*, 2008), pode-se citar também sua ação sobre a formação da matriz extracelular óssea e no processo de remodelação óssea (SILA-ASNA *et al.*, 2007).

Alguns estudos experimentais envolvendo ratos mostraram que doses de 500mg/kg/dia e 1000mg/kg/dia aumentam a osseointegração de implantes, melhoram a microestrutura trabecular peri-implantar e aumentam a fixação do implante de uma maneira dose-dependente (LI, Y. *et al.*, 2010; MAIMOUN *et al.*, 2010). Já doses entre 625mg/kg/dia e 900mg/kg/dia estão relacionadas a um aumento no nível plasmático do estrôncio, assim como a um aumento no volume ósseo e na sua resistência (AMMANN *et al.*, 2004).

Para que o biomaterial exerça adequadamente seu papel no estímulo à atividade osteoblástica, é necessário que ocorra a sua estabilidade no sítio receptor. Porém, muitas vezes, após a sua aplicação em defeito crítico, com morfologia que dificulte a sua permanência, os seus grânulos podem ser deslocados. Nessas condições, faz-se necessária a utilização de um agente aglutinante que favoreça a estabilização do biomaterial no sítio implantado. Um agente já utilizado em várias situações clínicas é o selante de fibrina (CHEN *et al.*, 2009).

O selante de fibrina é um polímero natural, que promove angiogênese, fixação e proliferação celular, o que pode criar um meio propício para acelerar a regeneração óssea (OSATHANON *et al.*, 2008). O selante de fibrina é usualmente utilizado para contribuir na hemostase, auxiliar na sutura em procedimentos cirúrgicos e na adesão tecidual (EBERHARD; BRODER; WITZKE, 2006). Além disso, pode ser utilizado como um arcabouço para cultura e transplante de células, devido à sua biocompatibilidade, degradação biológica e pela sua propriedade de atração celular (LE NIHOANNEN *et al.*, 2007).

Seu mecanismo de ação está relacionado com a cascata de coagulação sanguínea, uma vez que simula a última etapa desse processo, na qual o fibrinogênio é convertido em fibrina pela ação da trombina, o que resulta em um coágulo de fibrina com propriedades adesivas (LE NIHOANNEN *et al.*, 2007).

Sua implantação no defeito, juntamente com grânulos de HA, forma um composto de fácil manipulação e inserção, impedindo a formação de espaços sem preenchimento de biomaterial (JEGOUX *et al.*, 2005). Estudos em animais mostraram que essa associação entre selante de fibrina e biocerâmicas é viável e contribui no processo de reparo ósseo, ao aprimorar as propriedades osteogênicas das biocerâmicas (JEGOUX *et al.*, 2005; LE NIHOANNEN *et al.*, 2007). Essa característica está relacionada a uma reação inflamatória capaz de promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (LE

NIHOUANNEN *et al.*, 2007). Essas células-tronco também podem ser adicionadas ao selante, o que torna a formação óssea mais rápida (LEE *et al.*, 2008). Pode ainda ser enriquecido com plaquetas, apresentando resultados satisfatórios (HUH *et al.*, 2006).

Desse modo, espera-se que um tratamento reabilitador que utilize biocerâmicas associadas a selantes de fibrina, juntamente com o uso sistêmico de ranelato de estrôncio, promova uma regeneração óssea adequada, em que o osso neoformado, no caso dos ossos maxilares, seja capaz de suportar cargas mastigatórias, assim como forças dinâmicas parafuncionais, sem que sofra fadiga ao longo do tempo (EARTHMAN *et al.*, 2006).

Para avaliar o potencial osteogênico desses materiais, existem métodos invasivos, como as biópsias, para avaliação histológica do osso neoformado, assim como as sondagens clínicas, que podem ser indicadas em algumas situações em periodontia e em implantodontia. Como esses métodos podem interferir diretamente na cicatrização tecidual (DANESHMEYER; CHEN; RAMS, 2002), pode-se optar por métodos não-invasivos, como as radiografias e tomografias computadorizadas. Essa avaliação é muito importante na reabilitação, já que a qualidade do osso neoformado e a localização do defeito podem interferir, por exemplo, no sucesso de cirurgias para colocação de implantes. Desse modo, é importante a realização de métodos não-invasivos para avaliação do osso neoformado.

### **2.2.3 Métodos imaginológicos na avaliação do tecido ósseo**

O tecido ósseo pode ser avaliado tanto por imagens radiográficas, como por métodos avançados de imagem. As primeiras constituem-se como os exames iniciais em qualquer tratamento, por serem de fácil acesso e de baixo custo, embora possuam uma grande limitação: fornecem informações em apenas duas dimensões de estruturas tridimensionais e produzem, em algumas incidências, imagens finais com ampliações (GUTTENBERG, 2008). Elas ainda fornecem pouca informação sobre a densidade e a espessura do tecido ósseo, bem como sobre a proximidade espacial com estruturas vitais (GANZ, 2008), desvantagens que dificultam um diagnóstico mais preciso.

Os exames avançados de imagem, como a tomografia computadorizada (TC), por seu turno, conferem informações das três dimensões (largura, comprimento e espessura) das estruturas investigadas e, por isso, permitem avaliar quantitativamente a macroestrutura do tecido ósseo (GENANT; JIANG, 2006). Dentre outras vantagens, podem-se citar a

capacidade de eliminar a sobreposição de estruturas na imagem final, bem como apresentar imagens em tamanho real e possibilitar reconstruções da imagem em vários planos (CRUSOÉ-REBELLO *et al.*, 2009).

Este é um exame que utiliza radiação ionizante para obtenção das imagens tomográficas seccionais, formadas pela atenuação da radiação X ao interagir com os tecidos do corpo (FIROOZABADI *et al.*, 2008). Ela está indicada no diagnóstico, planejamento terapêutico e no acompanhamento de tratamentos (COSTA E SILVA; ANTUNES; CAVALCANTI, 2003). Em casos de fraturas (STEINBERG; STERNHEIM; BLACHAR, 2010) e patologias ósseas, permite determinar sua extensão com precisão, assim como sua densidade relativa (GUTTENBERG, 2008), pela medida do coeficiente de atenuação dos diferentes tecidos (CRUSOÉ-REBELLO *et al.*, 2009).

O coeficiente de atenuação tecidual é representado numericamente por uma escala de valores conhecida por Unidades *Hounsfield* (UH), que apresenta a quantidade de radiação absorvida pela estrutura e está relacionada com a densidade e o número atômico do tecido avaliado (CRUSOÉ-REBELLO *et al.*, 2009). Essa escala é baseada no valor da densidade do ar, água e osso denso, aos quais foram determinados os valores de -1000, 0 e +1000, respectivamente (SHAPURIAN *et al.*, 2006). Como é uma medida sítio-específica, objetiva e quantitativa, sofre pouca interferência da experiência do avaliador (REBAUDI *et al.*, 2010).

Desse modo, o conhecimento dessa escala e uma correta interpretação dos seus achados a tornam uma ferramenta valiosa de diagnóstico, que avalia de forma objetiva a densidade óssea e, assim, fornece informações únicas ao cirurgião sobre o sítio para planejamento de implantes (REBAUDI *et al.*, 2010; SHAPURIAN *et al.*, 2006; TURKYILMAZ *et al.*, 2008), assim como de mini-implantes, em casos de tratamento ortodôntico (CHOI *et al.*, 2009). Ela ainda pode ser aplicada para distinguir lesões ósseas, assim como avaliar o conteúdo de lesões císticas (CRUSOÉ-REBELLO *et al.*, 2009). Em casos de distrações osteogênicas, pode ser utilizada para avaliar a formação óssea, permitindo, inclusive, comparar a densidade do osso normal e do neoformado (HASHEMI; JAVIDI, 2010).

A TC possui algumas limitações, dentre elas o custo do aparelho e do exame, a dose de radiação, e o fato de o aparelho ser fechado, o que leva alguns pacientes a se sentirem claustrofóbicos durante o exame (GUTTENBERG, 2008). Além disso, sua resolução de imagem não permite determinar com precisão a arquitetura da trabécula óssea (GRIFFITH; ENGELKE; GENANT, 2010) e, por isso, impossibilita a visualização e o diagnóstico de um osso de qualidade.

Apesar de suas limitações, é um exame excelente, por fornecer informações únicas sobre o tecido ósseo e o tecido mole. Na tentativa de contornar suas limitações, foi desenvolvida, na década de 90, uma nova tecnologia de TCs a Tomografia Computadorizada *Cone Beam* (TCCB). A tecnologia do feixe cônico ou *Cone Beam* possui vastas aplicações nos campos médicos e odontológicos. Dentre elas, podem-se citar aplicações em radioterapia oncológica, radiologia intervencionista, otorrinolaringologia, avaliação do complexo maxilo-mandibular para o planejamento de implantes, avaliação da articulação temporo-mandibular na investigação de alterações ósseas degenerativas, avaliação de dentes inclusos, além da avaliação de infecções, cistos ou tumores ósseos (EDWARDS, 2010; WHITE; PHAROAH, 2008).

Como o valor do *voxel* (elementos de volume) da imagem do TCCB não é um valor absoluto (NAITOH *et al.*, 2010), associado ao ruído da imagem (HUA *et al.*, 2009), não é possível aplicar o UH nessas imagens tomográficas. Porém faz-se necessário avaliar a qualidade óssea nessas imagens. Para isso, foi proposta uma linha de regressão com a qual se obtiveram resultados satisfatórios (NAITOH *et al.*, 2010). Entretanto, outros autores postulam que a análise fractal e a medida da área óssea apresentam resultados satisfatórios na avaliação da qualidade óssea. Entretanto, a análise de densidade apresentou resultados insatisfatórios (HUA *et al.*, 2009).

Ela, portanto, visa a reproduzir a imagem tridimensional de tecidos mineralizados (GARIB *et al.*, 2007), o que torna possível a visualização precisa da morfologia do defeito ósseo, assim como um planejamento de tratamento por regeneração tecidual guiada, além de ser possível acompanhar a cicatrização do defeito (TAKANE *et al.*, 2010).

Esses dois métodos de imagens tomográficas (TC e TCCB) possuem uma importante vantagem em comum, em se tratando de lesões ósseas extensas, pois, a partir de suas imagens, é possível a construção de protótipos teciduais (BAKHOS *et al.*, 2010; LAMBRECHT *et al.*, 2009).

A prototipagem é um método no qual reproduções de segmentos corporais são obtidas a partir de imagens tomográficas (YACUBIAN-FERNANDES *et al.*, 2004). Como são produzidas imagens em tamanho real, os protótipos resultantes corresponderão a moldes fidedignos dos defeitos ósseos (BAKHOS *et al.*, 2010). Dessa forma, eles fornecem ao profissional uma visão completa do problema do paciente, o que permite quantificar a sua deformidade e planejar a melhor modalidade terapêutica (EDWARDS, 2010). Assim, as vantagens desse procedimento consistem em um melhor planejamento cirúrgico, por permitir uma simulação cirúrgica e a criação de próteses (YACUBIAN-FERNANDES *et al.*, 2004),

além de estar relacionado com uma diminuição no tempo cirúrgico e de erros transoperatórios (ZHOU *et al.*, 2010).

Para a obtenção de um protótipo mais fidedigno, além de imagens de alta resolução, é necessário que elas tenham uma boa qualidade, de preferência com ausência de imagens resultantes de artefatos metálicos (EDWARDS, 2010), bem como permitam uma boa distinção entre tecidos moles e duros, o que é viabilizado pela medida das UHs. Como essa análise não é possível na TCCB, alternativas podem ser lançadas. Por isso, não se inviabiliza o seu uso na fabricação de protótipos ósseos (LAMBRECHT *et al.*, 2009).

A incapacidade de discriminar o tecido mole, devido à sua baixa resolução de contraste, é uma das desvantagens da TCCB, quando comparada com a TC (GUERRERO *et al.*, 2006; SCARFE, FARMAN, 2008). Dentre outras limitações, pode-se citar a dose de radiação, que, apesar de ser menor do que a necessária para a obtenção de uma TC, é 4 a 43 vezes maior do que a necessária para a realização de uma radiografia plana (EDWARDS, 2010). Durante a realização do exame, pode ocorrer ainda a formação de radiação de espalhamento (BIANCHI *et al.*, 2010), a formação de ruído na imagem, além de imagens por artefatos. A soma desses fatores interfere na qualidade da imagem tomográfica (SCARFE; FARMAN, 2008). Contudo, apesar de ser um exame excelente para a visualização do tecido ósseo, ele apresenta detalhes apenas da macroestrutura desse tecido.

Para examinar a microestrutura óssea, alguns exames estão disponíveis, dentre eles a tomografia computadorizada de alta resolução (hrTC), a microtomografia computadorizada (micro-TC), a ressonância magnética de alta resolução (hrMR) e a ressonância micromagnética (micro-RM) (GENANT; JIANG, 2006).

A micro-TC é um exame que utiliza radiação ionizante, em feixes cônicos, para obtenção de imagens tomográficas em três dimensões (EFEOGLU *et al.*, 2007). Ela está indicada para análise de pequenas biópsias ósseas e envolve, normalmente, estudos *in vitro* (GENANT; JIANG, 2006). Possui uma alta resolução espacial, o que permite detectar pequenas estruturas (KOBAYASHI *et al.*, 2003), como a microestrutura óssea (HANSON; BAGI, 2004) e, por isso, é uma ferramenta útil para avaliar a arquitetura desse tecido em resposta a forças dinâmicas e estáticas, pela propagação de estresse, além de avaliar falhas estruturais iniciais e a sua propagação. Está indicada também no estudo da cicatrização óssea peri-implantar e para avaliar as propriedades biomecânicas na interface osso-biomaterial osteocondutor (CANO *et al.*, 2008).

Além de sua aplicação na avaliação do tecido ósseo, ela pode ser utilizada ainda para a caracterização morfométrica de substitutos ósseos aloplásticos (MALAFAYA; REIS, 2009),

assim como, em casos de biomateriais porosos, para definir a espessura, tamanho e distribuição dos seus poros (KLEIN *et al.*, 2009). Permite avaliar também as propriedades físicas de difusão, elasticidade e permeabilidade do material e suas propriedades mecânicas (KNACKSTEDT *et al.*, 2006). A associação dessas informações com a capacidade de mostrar o crescimento tecidual no interior do biomaterial (KNACKSTEDT *et al.*, 2006) permite avaliar se a dinâmica da osteocondução e osteoindução estão ocorrendo e, a partir dessas observações, planejar modificações no tamanho e na geometria do biomaterial (KLEIN *et al.*, 2009).

As imagens dos ossos longos obtidas por esse método são similares às observadas pelo exame do tecido ósseo por métodos histológicos e histomorfométricos. Porém possuem algumas vantagens, pois a biópsia tecidual permanecerá íntegra, ou seja, o espécime não será cortado para obtenção de lâminas. Além disso, o tempo para análise é reduzido, já que não há necessidade de preparação da amostra para inclusão em parafina ou em metil-metacrilato, e o espécime será avaliado em imagens tomográficas nos mesmos planos e cortes que seriam observados em lâminas histológicas (HANSON; BAGI, 2004). Por isso, esse exame pode ser considerado como biópsia virtual (CANO *et al.*, 2007).

Essa metodologia tem sido aplicada para avaliação da neoformação óssea em defeito crítico (BURASTERO *et al.*, 2010; EBINA *et al.*, 2009; EFEOGLU *et al.*, 2007; EFEOGLU *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010; PETRI ARONIN *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009). Dentre as possíveis análises aplicáveis estão a média de valores de *pixel* da imagem, a medição do volume ósseo e a avaliação da área de superfície (EFEOGLU *et al.*, 2007), pela seleção da área de interesse da imagem (HANSON; BAGI, 2004), o que permite avaliar se a regeneração óssea nos sítios com defeito está ocorrendo (EFEOGLU *et al.*, 2009). Além disso, por examinar a microestrutura óssea, permite apreciar a qualidade desse tecido, o que seria essencial para os sítios que servirão de suporte para implantes ósseo-integrados ou que receberão grandes cargas mastigatórias.

Aparelhos mais modernos permitem acompanhar a formação óssea e a integração do biomaterial com o tecido através de modelos animais *in vivo*, além de avaliar a resposta individual de cada animal, reduzindo a possibilidade de viés e possibilitando a redução do número de animais utilizados nos estudos (LEE *et al.*, 2010).

Os métodos de imagens em alta resolução ainda não estão disponíveis para aplicações clínicas, e o seu uso é limitado para experimentos em animais pequenos ou em estudos de amostras *in vitro* (CANO *et al.*, 2007). Porém, quando se tornar aplicável em seres humanos, será uma ferramenta valiosa na monitoração da cicatrização óssea e na avaliação de doenças

desse tecido (EFEOGLU *et al.*, 2009). Entretanto, é válido ressaltar que, como a análise em micro-TC exige uma biópsia tecidual, ela não deverá ser utilizada rotineiramente em humanos (REBAUDI *et al.*, 2010), restringindo-se aos casos em que uma biópsia seria realizada impreterivelmente.

A alta resolução da micro-TC torna-a superior à TC e aos exames planos de imagem para observar as alterações estruturais do biomaterial. Enquanto a resolução espacial da TC varia entre 0,5 a 1mm, a da micro-TC é da ordem de 25 $\mu$ m. Já a baixa resolução dos exames planos de imagem torna difícil a distinção entre as densidades do tecido ósseo e do biomaterial (LU; RABIE, 2003). Porém, enquanto a utilização da micro-TC não for possível, a TC permanece sendo uma solução viável *in vivo*, já que, apesar das vantagens inerentes à micro-TC, já foi demonstrado que medidas realizadas nela e na TC mostraram ser similares estatisticamente (REBAUDI *et al.*, 2010) e que o uso de programas de processamento de imagem contribuem na quantificação e visualização de pequenas estruturas, como a trabécula óssea em imagens de TC (KOBAYASHI *et al.*, 2003).

## **2.2.4 Imagens radiográficas na avaliação do reparo ósseo**

O desenvolvimento de métodos não-invasivos, que substituam a análise histológica por meio de biópsias, é crucial (BOZZO *et al.*, 2004), uma vez que métodos invasivos podem ter um efeito prejudicial na cicatrização dos sítios regenerados (DANESH-MEYER; CHEN; RAMS, 2002). A radiografia é um método rápido e barato, quando comparado com a avaliação histológica (PRYOR; SUSIN; WIKESJÖ, 2006). Além disso, pacientes mutilados por traumas ou tumores ósseos devem ser reabilitados proteticamente, e uma avaliação não-invasiva, que possibilite determinar a qualidade do osso de suporte neoformado, é muito importante.

Ao avaliar histologicamente o potencial da HA na neoformação óssea em defeitos críticos, Barreto (2008) observou um aumento da vascularização nas bordas ósseas, assim como neoformação óssea mais evidente nessa região no tempo biológico de 45 dias, enquanto que, aos 120 dias, a proliferação vascular foi observada em toda a extensão do defeito, com formação de tecido ósseo circundando a HA, principalmente na proximidade das margens do defeito. Chen e colaboradores (2009) avaliaram subjetivamente por radiografia convencional o potencial osteocondutivo de um material composto de tricálcio fosfato em defeitos críticos e

concluíram que, nos tempos biológicos de quatro e oito semanas, foi possível observar o crescimento de novo osso no defeito ósseo.

Apesar de o exame histopatológico possibilitar avaliar os componentes celulares presentes na regeneração tecidual, alguns estudos mostraram que é possível acompanhar o processo de neoformação óssea por exames radiográficos. Okazaki e colaboradores (2000) compararam os achados histológicos e radiográficos de defeitos não-críticos em tíbias de ratos. Observaram formação óssea ao redor das margens do bloco de HA após 28 dias de implantação, por ambos os métodos. Já Huh e colaboradores (2006) observaram radiográfica e histologicamente uma maior formação óssea no grupo que recebeu osso autólogo e selante de fibrina, do que no grupo de animais onde o defeito crítico foi preenchido exclusivamente com osso autólogo.

Ao acompanhar o processo de neoformação óssea em defeitos ósseos, Wang e colaboradores (2003) afirmaram que é possível distinguir microesferas de HA em radiografias devido à sua radiopacidade, assim como observar o processo de degradação do biomaterial à medida que ocorre a neoformação óssea. Tais resultados validariam esse método como uma alternativa no acompanhamento de tratamentos regenerativos teciduais ósseos.

Porém a radiopacidade do biomaterial pode dificultar o acompanhamento da formação óssea. Yun e colaboradores (2010) observaram que os achados radiográficos não correspondiam aos histológicos, principalmente quando o biomaterial utilizado fosse radiopaco. Uma vez que não era possível distinguir, radiograficamente, o osso neoformado do biomaterial (ZHUKAUSKAS *et al.*, 2010), Pryor, Susin e Wikesjö (2006) complementaram que a radiografia possui pouca acurácia de diagnóstico para analisar formações ósseas iniciais em modelos de defeito crítico em calvária de ratos, quando comparada com o exame histopatológico, fato relacionado à pouca mineralização do tecido neoformado em estágios iniciais (TAGA *et al.*, 2008). Assim, a dificuldade em distinguir o osso neoformado do biomaterial pode estar correlacionada com uma limitação do olho humano em diferenciar os tons de cinza da imagem (CARVALHO *et al.*, 2009).

Desse modo, quando *softwares* de computador são utilizados para avaliar esse processo, os resultados são mais satisfatórios. A aplicação da ferramenta da média de valores de *pixel* em radiografias digitais, para acompanhar a regeneração óssea em defeitos críticos, mostra que essa média é maior no grupo que recebeu o biomaterial do que naquele onde o defeito permaneceu vazio (ZHANG *et al.*, 2010b). Entretanto, mesmo essa ferramenta sendo muito útil, se o biomaterial for rapidamente biodegradado e não contribuir na formação óssea, ela pode não fornecer informações adicionais (SPIN NETO, 2008).

Ao aplicar essa análise, a formação óssea será observada gradualmente, porém, em estágios mais avançados, a densidade óssea radiográfica será mais evidente (ZHANG *et al.*, 2010a). Nos estágios iniciais, um método mais sensível, como a micro-TC, está indicado (NIEMEYER *et al.*, 2010a). Porém, como as radiografias, convencionais ou digitais, são mais acessíveis e baratas do que os exames avançados de imagem, como as tomografias, a associação entre diferentes análises radiográficas pode contribuir no acompanhamento do processo de regeneração tecidual.

Em radiografias com subtração digital de calvárias de coelho, foi quantificada a densidade radiográfica da neoformação óssea pela média de valores de *pixels*. No grupo que recebeu osso autólogo e no que recebeu osso autólogo juntamente com plasma enriquecido com plaqueta, a radiopacidade foi maior do que a observada no grupo controle e no que recebeu apenas plasma enriquecido com plaqueta. Tal resultado também foi observado pela análise histomorfométrica (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2002).

Análises densitométricas com utilização de um densitômetro também podem ser aplicadas em radiografias convencionais obtidas a partir de defeitos críticos em ratos. Elas confirmam os achados por análises subjetivas das imagens, assim como demonstram radiopacidade significativamente aumentadas nos grupos que receberam o biomaterial do que no controle (SAADEH *et al.*, 2001).

Outras metodologias foram propostas como análise objetiva das imagens pela aplicação de escores semiquantitativos para avaliar o grau de formação óssea durante o período de regeneração tecidual (SARKAR *et al.*, 2006). Ou mesmo aplicar escores qualitativos a partir dos resultados da análise de densidade radiográfica (NIEMEYER *et al.*, 2010b). As avaliações qualitativas das imagens radiográficas apresentam resultados satisfatórios e compatíveis com os achados do exame histopatológico (ZHUKAUSKAS *et al.*, 2010) e da micro-TC (BURASTERO *et al.*, 2010). Apesar de apresentarem certa concordância nos achados, as imagens radiográficas digitalizadas mostraram uma cicatrização óssea mais significativa do que pela avaliação qualitativa por micro-TC (PETRI ARONIN *et al.*, 2009).

Porém, como a maioria dos estudos descreve a quantidade de tecido neoformado em um nível semiquantitativo, os seus resultados são, assim, dependentes da avaliação subjetiva de cada avaliador (SCHÖNBERGER *et al.*, 2007) e podem sofrer influência da resolução da imagem, o que pode levar a um resultado falso-positivo, como, por exemplo, um sobrediagnóstico com a utilização de radiografias convencionais digitalizadas (PETRI ARONIN *et al.*, 2009).

Desse modo, um método ideal de avaliação da neoformação óssea em defeitos ósseos experimentais deve atender a alguns pré-requisitos: alta sensibilidade, para detectar as possíveis diferenças entre as imagens; alta especificidade, para detectar formação de novo osso; pouca influência do avaliador, evitando-se, por isso, a variabilidade entre observadores; dados facilmente reproduzíveis, com alta confiabilidade e baixa variabilidade entre observadores; e aplicabilidade em qualquer modelo animal experimental (SCHÖNBERGER *et al.*, 2010).

Tal método deve também ser capaz de superar algumas limitações relacionadas às propriedades físicas intrínsecas e às múltiplas variáveis envolvidas durante o exame radiográfico. Condições de exposição (tempos de exposição não-padronizados), distância entre foco e filme, lote do filme, coeficientes de atenuação e a filtração da radiação X por filtros de alumínio podem fazer com que o brilho e o contraste da radiografia de um mesmo indivíduo variem, o que limita a avaliação do osso e a mensuração da sua densidade mineral (BELTRAME *et al.*, 2005). Isso contribui para que a quantificação do osso neoformado em modelos experimentais de defeito ósseo seja um grande problema (SCHÖNBERGER *et al.*, 2007). Desse modo, para avaliar corretamente a progressão da mineralização em defeitos ósseos críticos, é necessário o desenvolvimento de métodos que garantam padronização, tanto no posicionamento do indivíduo quanto no tempo de exposição selecionado, além de um controle adequado na corrente elétrica que alimenta o aparelho de radiação X, para que sejam evitados picos de corrente que influenciariam na densidade final da radiografia.

Atentando para esses cuidados, Schönberger e colaboradores (2007) desenvolveram um método quantitativo para essa avaliação em radiografias digitais, que mostrou ser seguro, fácil de usar, e que fornece informações detalhadas na avaliação do tecido regenerado, quando comparado a métodos semiquantitativos. Esse método constitui-se de cinco etapas: 1 – padronização do tamanho e da cor da radiografia; 2 – delimitação da região de interesse (ROI); 3 – definição da qualidade de mineralização; 4 – análise do valor médio dos *pixels* e do histograma; 5 – quantificação (SCHÖNBERGER *et al.*, 2007; SCHÖNBERGER *et al.*, 2010).

No modelo proposto por Beltrame e colaboradores (2005), enfatiza-se a necessidade de ferramentas de calibração de imagem, pelo uso de escalas de alumínio ou pelo uso de *softwares* que permitam o uso de um algoritmo de calibração para análise semiquantitativa de imagens radiográficas despadronizadas, como uma ferramenta de avaliação da regeneração óssea pelo uso de biomateriais. Eles validaram esse método e mostraram sua importância na quantificação da deposição contínua de tecido ósseo mineralizado no defeito ósseo de grandes dimensões.

O uso de escalas de alumínio na realização de radiografias permite uma padronização das avaliações (LOUZADA *et al.*, 2001), já que atua como uma referência interna, ao corrigir, por exemplo, variações na densidade da imagem decorrentes de atenuações diferentes dos feixes de raios X (TRÉ *et al.*, 2006). Como o alumínio possui uma curva de absorção da radiação X muito semelhante à do osso (LOUZADA, 1994), é possível calcular, a partir dos valores médios de *pixels* de cada degrau da escala, a densidade óssea em valores equivalentes em milímetros de alumínio (mmAl) (TRÉ *et al.*, 2006). Dentre outras vantagens, como o alumínio possui uma densidade conhecida, isso garante uma reprodutibilidade das medições, assim como padroniza os valores em uma unidade única, que pode ser utilizada como parâmetro em outras pesquisas.

Desse modo, é de suma importância o desenvolvimento e a realização de estudos que envolvam métodos radiográficos quantitativos para a avaliação da regeneração óssea em sítios com grande perda tecidual.

### **3 OBJETIVO**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar métodos radiográficos na neoformação óssea.

### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1 – Comparar por métodos radiográficos digitalizados e digital (DenOptix<sup>®</sup>), o reparo tecidual em defeito crítico na calvária de rato, preenchido com HA e/ou selante de fibrina, submetido à dieta convencional,

2 – Comparar por métodos radiográficos digitalizados e digital (DenOptix<sup>®</sup>), o reparo tecidual em defeito crítico na calvária de rato, preenchido com HA e/ou selante de fibrina, submetido à administração sistêmica de ranelato de estrôncio,

3 – Avaliar os métodos média dos valores de pixel, subtração digital da imagem e conversão em valores equivalentes em mmAl na análise da radiopacidade tecidual.

## **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 BIOMATERIAL

O biomaterial em microesferas de HA foi desenvolvido, preparado, caracterizado e fornecido pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Esse biomaterial foi produzido a partir de uma solução aquosa de HA. Ela foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ -0,15M), utilizando-se uma única seringa para formar microesferas com diâmetro entre 250 e 425 $\mu\text{m}$ . Após 24 horas de incubação, em temperatura ambiente, elas foram recolhidas com uma peneira apropriada e, então, sinterizadas em rampa de aquecimento até 1100°C (Figura 1).



Figura 1 – Hidroxiapatita

Foi utilizado também um selante de fibrina (Tissucol<sup>®</sup> - Baxter, Viena, Austria) (Figura 2A) e a medicação Ranelato de Estrôncio (Protos<sup>®</sup> - Servier, Gidy, França) (Figura 2B), ambos obtidos comercialmente.



Figura 2 – Selante de fibrina (A) e ranelato de estrôncio (B)

#### 4.2 ANIMAIS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) (Protocolo n°003-09 CEUA UEFS) (Anexo A) e cumpriu as Normas de Ética em Pesquisa com Animais, assim como os Princípios de Biossegurança.

Neste estudo, foram utilizados 55 ratos *Rattus norvegicus* da linhagem wistar, albinos, machos, adultos, com peso de aproximadamente 350 a 400g, de três a quatro meses de idade. Entretanto, para a composição da amostra, foram utilizados 45 animais, diferença relacionada com a perda de animais no período pós-operatório. Todos os animais foram operados e mantidos em observação no pós-operatório, no Biotério da UEFS.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para a composição de nove grupos, avaliados no ponto biológico de 45 dias (Tabela 1):

Grupo CO – Grupo de controle: os defeitos foram mantidos sem preenchimento com biomateriais, apenas com a presença de coágulo sanguíneo.

Grupo HA – Os defeitos foram preenchidos com microesferas de HA.

Grupo SF – Os defeitos foram preenchidos unicamente com selante de fibrina (SF): Tissucol®.

Grupo HA/SF – Os defeitos foram preenchidos por microesferas de HA e por selante de fibrina: Tissucol<sup>®</sup>.

Grupo RE – Os animais receberam dieta com 337,5g de ranelato de estrôncio (RE), Protos<sup>®</sup>, e não houve implantação do biomaterial nos defeitos ósseos.

Grupo HA/RE – Os defeitos foram preenchidos com microesferas de HA, e os animais receberam dieta com 337,5g de ranelato de estrôncio: Protos<sup>®</sup>.

Grupo SF/RE – Os defeitos foram preenchidos com selante de fibrina, Tissucol<sup>®</sup>, e os animais receberam dieta com 337,5g de ranelato de estrôncio: Protos<sup>®</sup>.

Grupo HA/SF/RE – Os defeitos foram preenchidos com HA e selante de fibrina, Tissucol<sup>®</sup>, e os animais receberam dieta com 337,5g de ranelato de estrôncio: Protos<sup>®</sup>.

Grupo PO – Grupo densidade padrão ouro (PO) para análise radiográfica: foram realizadas pequenas demarcações com fresa cirúrgica na calvária de animais hígdos, quando estavam com 4,5 a 5,5 meses de idade, correspondentes a 45 dias pós-operatórios, para localizar a área correspondente aos defeitos ósseos e estabelecer, radiograficamente, o padrão ósseo e a densidade ouro nessa região.

Tabela 1 – Número de animais segundo grupo e tempo biológico

Grupo Período	CO	HA	SF	HA/ SF	RE	HA/ RE	SF/ RE	HA/SF /RE	PO	Total
45 dias	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45

Fonte: Dados da pesquisa, 2010.

Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em gaiolas identificadas e autoclavadas, forradas com cama de *maravalhas de pinus* autoclavada e trocada diariamente, alimentados e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura e luminosidade. Os animais sofreram eutanásia no tempo biológico de 45 dias pós-operatórios.

Os animais dos grupos RE, HA/RE, SF/RE e HA/SF/RE receberam dieta de ranelato de estrôncio, seguindo protocolo adaptado de Ammann e colaboradores (2004), da seguinte maneira: foi fornecido aos animais água *ad libitum* e ração sólida (Nuvilab – Nuvital, Paraná,

Brasil), triturada e misturada a 900mg/kg/dia, correspondentes a, aproximadamente, 337,5g de ranelato de estrôncio, durante todo o período do experimento.

#### 4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA DAS LESÕES ÓSSEAS

Os animais foram anestesiados com injeções intramusculares de cloridrato de quetamina a 10% (Cetamin, do Laboratório Syntec, São Paulo, Brasil), na proporção de 0,12mL/100g de massa corpórea, enquanto a analgesia e a sedação foram realizadas com injeções intramusculares de cloridrato de xilazina (Dopaser - Laboratório Hertape Calier, Barcelona, Espanha), na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea (Figura 3). Os animais foram tricotomizados na região da calvária (Figura 4A); em seguida, foi realizada uma antissepsia com álcool iodado do campo operatório (Figura 4B) e, então, posicionados em decúbito ventral para acesso à calvária (Figura 5).



Figura 3 – Preparação pré-cirúrgica dos animais: realização de anestesia intramuscular



Figura 4 – Preparação pré-cirúrgica dos animais: tricotomia (A) e antissepsia com álcool iodado (B)



Figura 5 – Preparação pré-cirúrgica dos animais: montagem do campo cirúrgico e posicionamento do animal em decúbito ventral

Uma incisão cutânea bicoronal foi realizada, com aproximadamente 3,0cm de extensão, utilizando-se lâmina de bisturi nº15 (Figuras 6A e 6B). Em seguida, foi feita uma divulsão com tesoura de ponta reta e romba, e elevação do retalho para acesso ao perióstio (Figura 6C), que foi incisado e removido, utilizando-se uma espátula nº7 e pinça clínica, para exposição do tecido ósseo (Figura 6D).

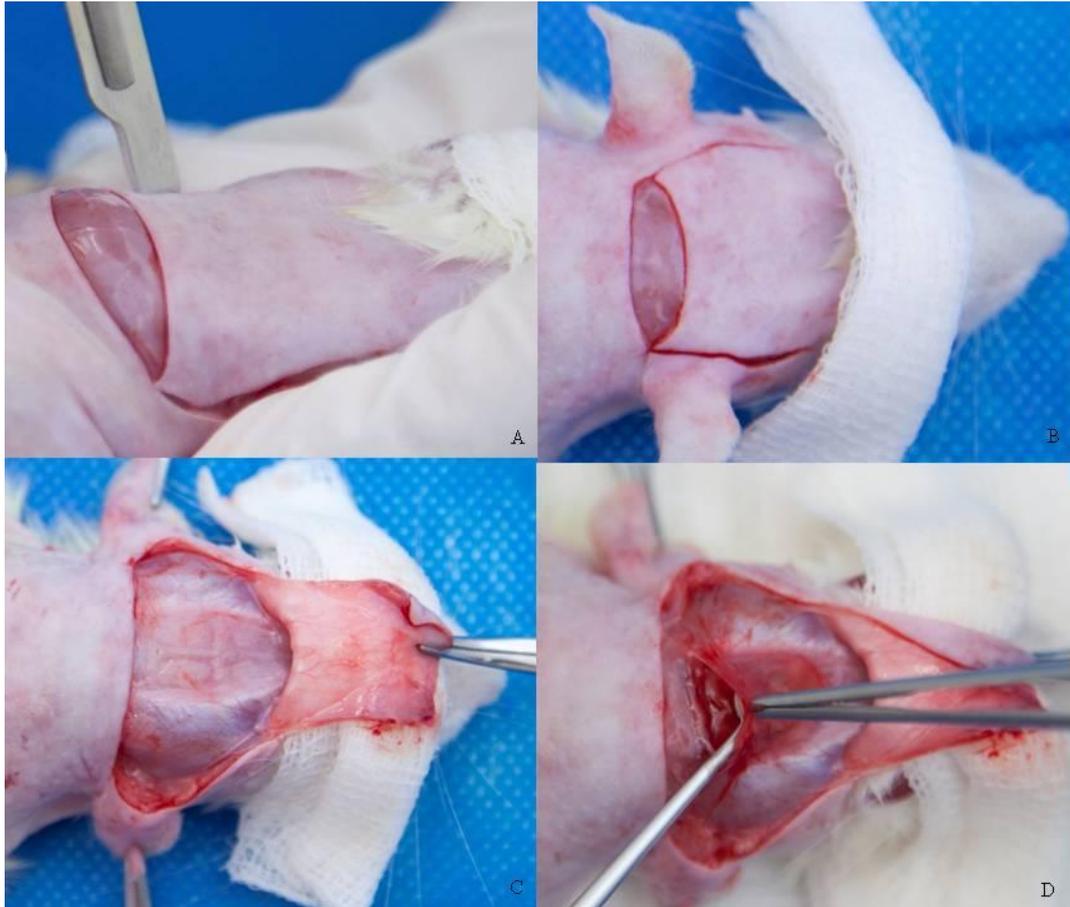


Figura 6 – Etapas cirúrgicas: incisão bicoronal cutânea (A, B), divulsão e elevação do retalho (C), remoção do periósteo (D)

O defeito crítico foi confeccionado com uma fresa trefina de aproximadamente 8,5mm de diâmetro externo (Dentoflex, São Paulo, Brasil), montada em contra-ângulo (Dabi Atlante, São Paulo, Brasil), com redução de 1:16, acoplada a um motor cirúrgico (Driller BLM 600 Plus, São Paulo, Brasil) de 1500rpm (Figura 7A). O defeito ósseo de cerca de 1mm de espessura, devido à espessura óssea da calvária, foi confeccionado entre os vértices das suturas anterior e posterior, sob irrigação constante de solução salina (Figuras 7B e 7C). Por fim, o biomaterial foi implantado no defeito, ou não (Figuras 7D e 7E), ao que se seguiu a reposição e a sutura interrompida do retalho com fio de seda 3.0 (Figura 7F). As microesferas de HA, quando utilizadas, foram previamente esterilizadas em autoclave a 120°C por 30 minutos, e o selante de fibrina foi mantido em estufa a uma temperatura de 37°C, para se evitar coagulação do produto.

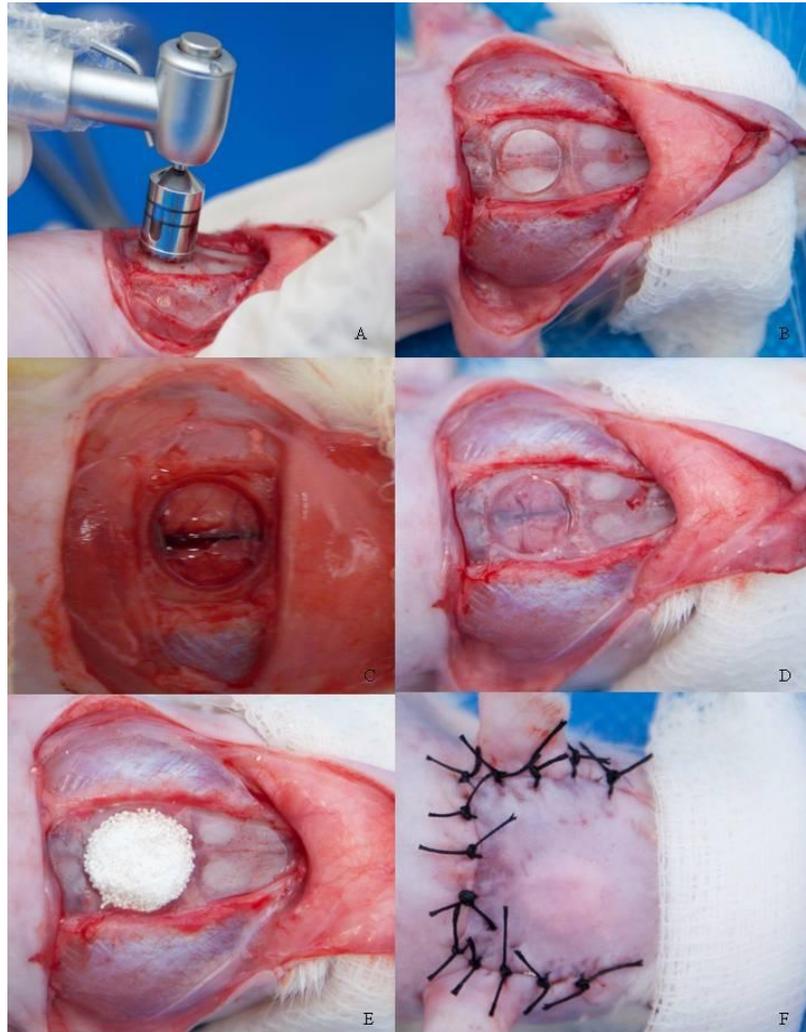


Figura 7 – Etapas cirúrgicas: confecção do defeito ósseo com broca trefina (A, B); defeito ósseo confeccionado (C); defeito ósseo preenchido com selante de fibrina (D); e com hidroxapatita (E); rebatimento do retalho, seguido de sutura interrompida (F)

#### 4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

##### 4.4.1 Preparação dos animais

Os animais dos grupos CO, HA, SF, HA/SF, RE, HA/RE, SF/RE, HA/SF/RE sofreram eutanasia, utilizando-se doses letais de cloridrato de quetamina, após 45 dias pós-operatórios, correspondentes, respectivamente, à faixa de 4,5 a 5,5 meses de idade.

Já os animais do grupo PO foram eutanasiados quando possuíam 4,5 a 5,5 meses de idade e, em seguida, foram operados para realização da demarcação na calvária utilizando a fresa trefina, para definir os limites do defeito sem a remoção do osso.

Os animais foram dissecados para remover toda a porção superior da calvária, incluindo tecidos moles. Os espécimes foram colocados em recipientes plásticos identificados, com solução de formol tamponado a 4%, para fixação. Cerca de quatro dias depois, os espécimes foram levados ao serviço de Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), para realização das imagens radiográficas.

#### 4.4.2 Preparação do corpo de prova

Foi realizada, também, uma radiografia das microesferas de HA para determinar a sua densidade. Para isso, foi realizada uma demarcação na cera utilidade, com cerca de 1mm de espessura, utilizando uma das calotas ósseas removidas durante o ato cirúrgico. As microesferas de HA foram então colocadas sobre a cera, simulando uma condição clínica (Figura 8). E, então, foram obtidas as imagens radiográficas (Figura 9).



Figura 8 – Preenchimento da cera utilidade com microesferas de HA, simulando uma condição clínica

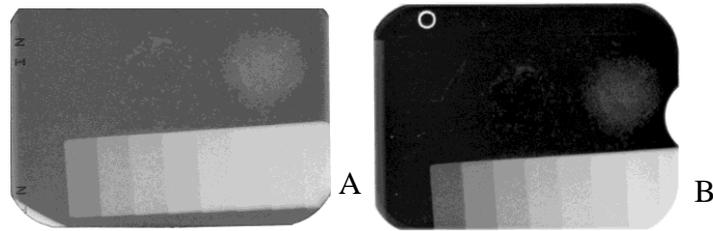


Figura 9 – Radiografia das microesferas de HA: A - Radiografia convencional digitalizada; B- Radiografia digital

#### 4.5 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Os espécimes foram transportados para o Ambulatório de Radiologia Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFBA, que dispõe de todos os equipamentos necessários para a obtenção das imagens radiográficas convencionais e digitais e para as suas análises. As exposições foram realizadas utilizando-se o aparelho Expert DC (Gendex Dental System, Itália) de quilovoltagem e miliamperagem fixas em 65kVp e 7mA, respectivamente, a uma distância foco-receptor de 34cm, garantida por um suporte de acrílico (Figura 8). No total, 90 tomadas radiográficas foram obtidas, uma vez que cada espécime foi radiografado 2 vezes, pelos métodos convencional (Filme Insight – Carestream Health, Nova York, EUA) e digital (DenOptix<sup>®</sup> - Dentsply International/Gendex<sup>®</sup> Dental X-ray Division, Illinois, EUA).

Inicialmente, foram obtidas 10 imagens radiográficas do Grupo IX, com cinco tempos de exposição diferentes. Essas imagens serviram para determinar o tempo de exposição (TE) adequado para cada um dos sistemas. Após a avaliação das imagens convencionais em um negatoscópio e das digitais em uma tela de computador, por três radiologistas com mais de cinco anos de experiência, definiu-se um TE de 0,125s para ambos os sistemas trabalhados.

As calvárias foram fixadas em uma única cera utilidade, para garantir reprodutibilidade e posições semelhantes nas diversas exposições. A cera foi fixada perto do suporte do filme, no posicionador de acrílico (Figura 10). Além de garantir uma padronização das imagens, esse suporte de acrílico possui uma placa de 1,2cm de espessura em acrílico, para reproduzir o tecido mole (Figura 10).

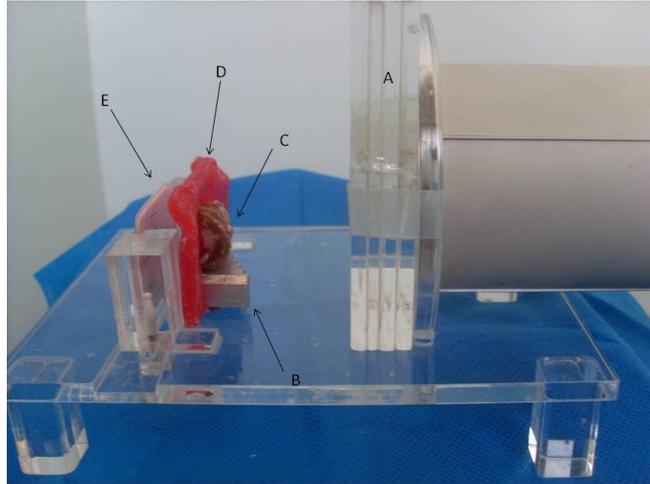


Figura 10 – Posicionador de acrílico para realização das tomadas radiográficas. A- Placa de acrílico; B – Escala de alumínio; C – Calvária; D – Cera utilidade; E – Filme radiográfico.

Uma escala de alumínio foi posicionada na cera, perto das calvárias (Figura 10B), em todas as tomadas radiográficas. Ela, além de garantir uma padronização da imagem radiográfica, possibilitou o cálculo da radiopacidade no interior do defeito ósseo. Foram adicionados também quatro marcadores de guta-percha (material radiopaco) nas margens do defeito ósseo, para facilitar as análises subsequentes (Figura 11).

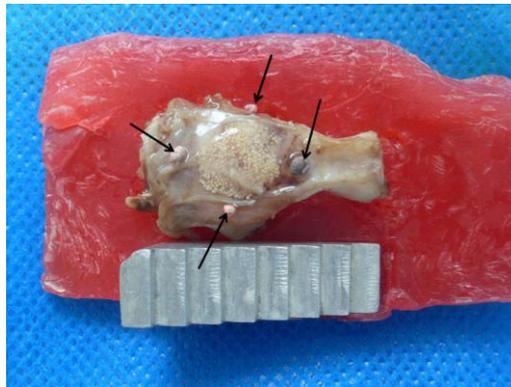


Figura 11 – Defeito ósseo demarcado por marcadores de guta-percha (setas pretas) e a escala de alumínio posicionada perto do espécime

Para obtenção das imagens foi selecionada uma única placa de armazenamento de fósforo (DenOptix<sup>®</sup>) de dimensão 30mm X 40mm (Figura 12A) e filmes convencionais tipo 2 (dimensão: 31mm X 41mm) e de sensibilidade E/F (Kodak Insight F-speed) (Figura 12B). A placa de armazenamento de fósforo foi escaneada no *scanner* do DenOptix<sup>®</sup>, imediatamente após sua sensibilização pela radiação X. Os arquivos foram exportados do *software* do

fabricante e salvos em formato TIFF (Tagged Image File Format). Elas foram colocadas em um negatoscópio por dois minutos, para garantir que a imagem fosse completamente apagada da placa de armazenamento de fósforo. Já os filmes convencionais foram processados utilizando-se uma processadora automática Gendex GXP (Dentsply International/ Gendex® Dental X-ray Division – Illinois, EUA), para permitir um maior controle desse processo e reduzir qualquer tipo de interferência. Posteriormente, foram digitalizadas utilizando-se um *scanner* com leitor de transparência (HP ScanJet G4050, Hewlett Packard Company, Greeley, Colorado, USA). As imagens foram escaneadas com 600dpi e salvas no formato BMP (Bitmap File Format).



Figura 12 – Películas radiográficas: A – Placa de armazenamento de fósforo (DenOptix®); B – Filme radiográfico *Insight* (Kodak)

#### 4.5.1 Avaliação das imagens

Todas as avaliações imaginológicas foram realizadas por um único avaliador, radiologista previamente calibrado, utilizando-se um monitor de tela plana, 17”, resolução 1280X1024 (LG Electronics – São Paulo, Brasil), em um ambiente de iluminação reduzida.

Para a avaliação das imagens foi utilizado o programa de domínio público Image J 1.43u (National Institute of Health, EUA) e, então, as ferramentas da média de valores de *pixel* e subtração digital foram aplicadas para cada imagem.

## 4.5.2 Valor médio de *pixel*

### 4.5.2.1 Avaliação do defeito ósseo

Para a realização dessa medida, foi selecionado um ROI (Região de Interesse) circular, utilizando-se os marcadores de guta-percha como guia (Figura 13), com cerca de 9mm de diâmetro. Essa marcação deveria envolver o centro da lesão sem tocar as margens do defeito, pois, nessa região a densidade óssea é elevada pela presença de osso hígido. Como o objetivo era o de avaliar o potencial osteogênico do biomaterial, essa medida foi realizada envolvendo o centro e a periferia do defeito, sem envolver a margem óssea. Feito isso, selecionou-se a ferramenta histograma, para obter-se o valor médio do *pixel* (Figura 14). Cada imagem foi avaliada três vezes, para garantir uma reprodutibilidade entre as medições. Após cada avaliação, foi selecionada a função recorte (Figura 15), e a área selecionada foi, então, salva como a imagem final para posteriormente ser utilizada para a subtração digital.

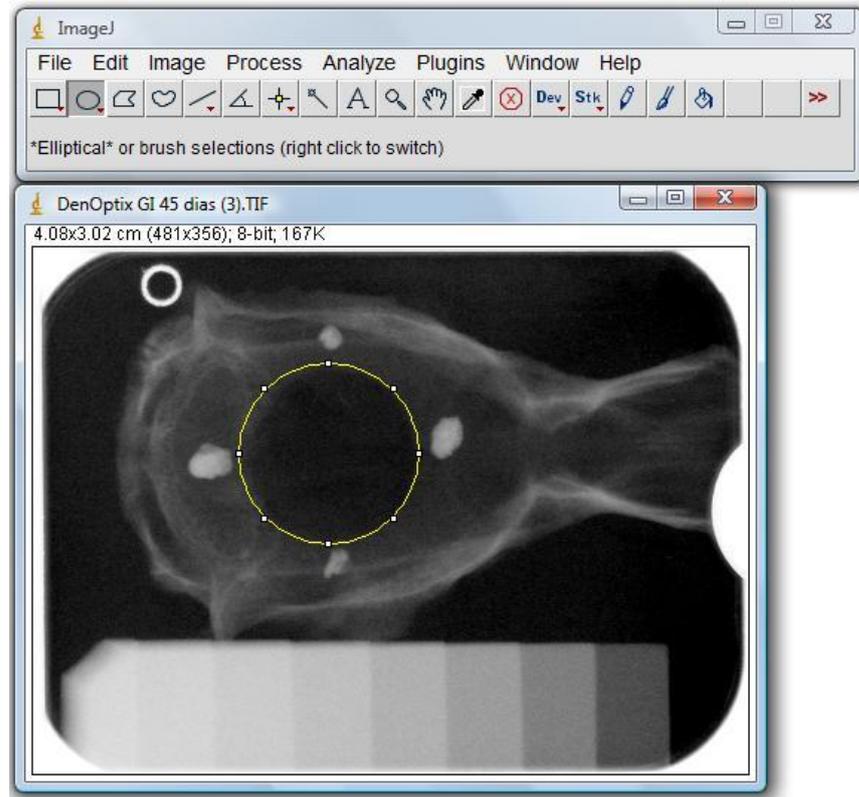


Figura 13 – Seleção do ROI circular envolvendo o defeito ósseo

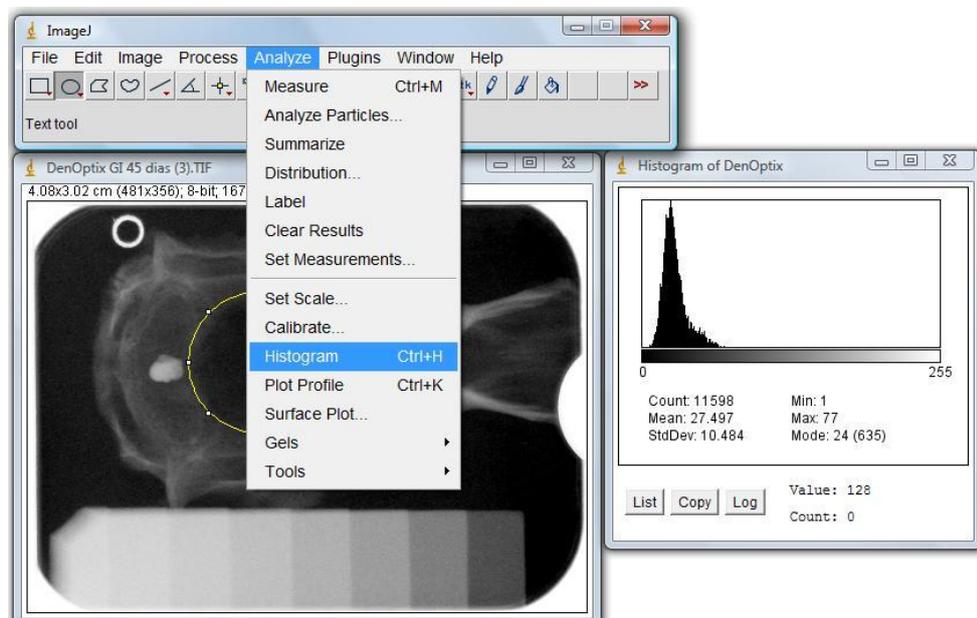


Figura 14 – Seleção da função histograma

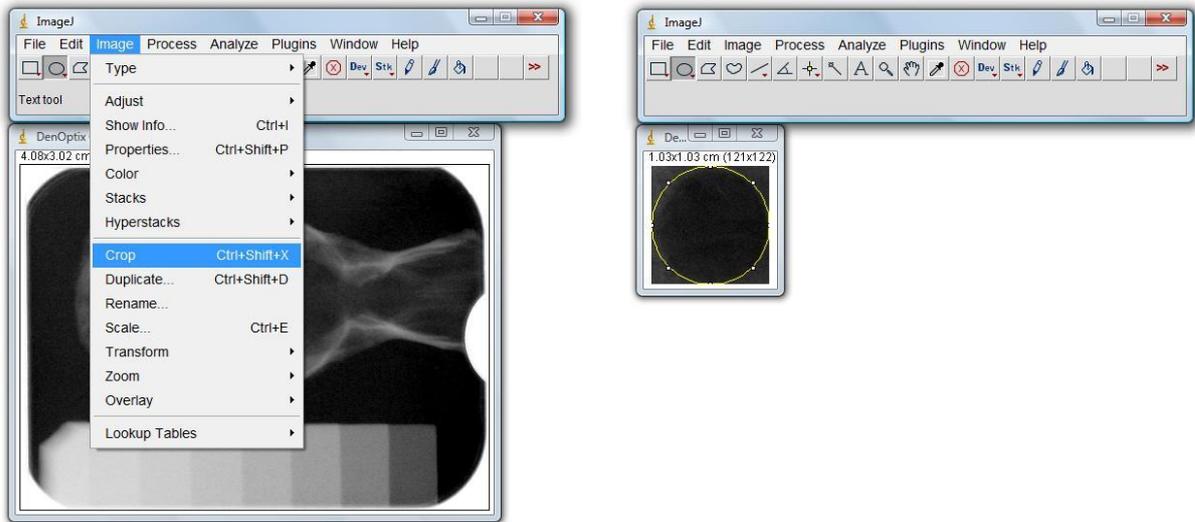


Figura 15 – Seleção da função recorte (A) e a imagem recortada (B)

No que se refere à interpretação dos resultados, utilizou-se como padrão ouro para essa análise a média de valores de *pixel* obtida do Grupo PO, o que possibilitaria distinguir e observar se existia alteração nos valores do *pixel* do osso neoformado em cada grupo avaliado, assim como entre eles e o osso normal (Grupo PO).

#### 4.5.2.2 Padronização pela escala de alumínio

A escala de alumínio foi utilizada para garantir uma padronização dos resultados. Desse modo, os valores médios de cinza obtidos no centro do defeito ósseo foram convertidos para valores equivalentes em mmAl.

Para essa análise, foi selecionado o ROI retangular do Image J 1.43u (National Institute of Health, EUA), e a sua demarcação deveria ocupar a maior área de cada degrau (Figura 16A). Em seguida, foi obtida a média dos valores de *pixel* de cada degrau da escala de alumínio. Esse procedimento foi repetido para cada imagem radiográfica (Figura 16B-C).

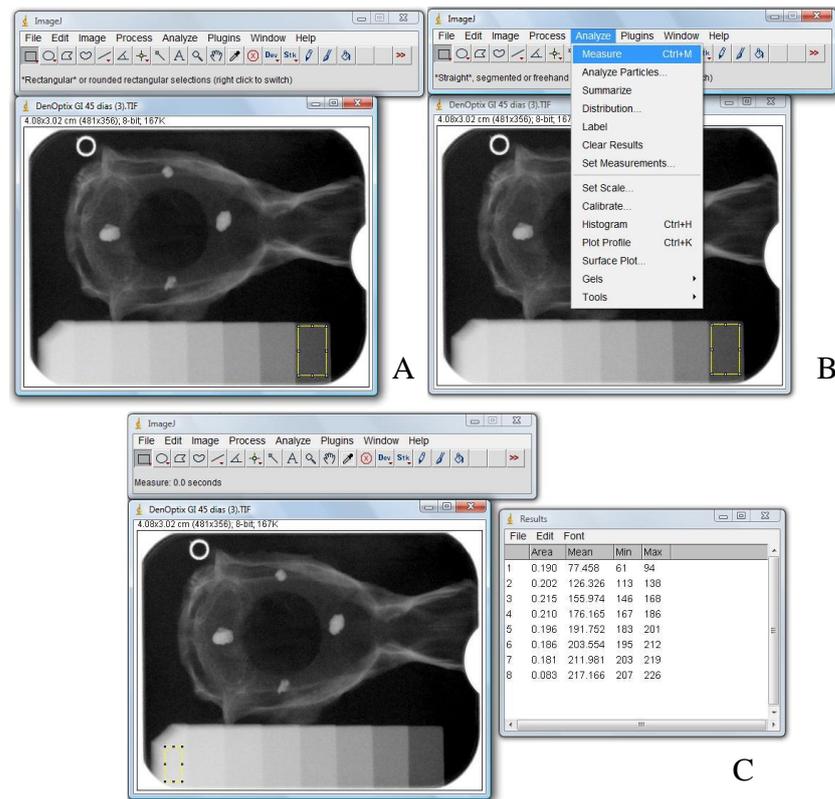


Figura 16 – Seleção do ROI retangular (A); realização das medidas em cada degrau da escala de alumínio (B); e obtenção das medidas (C)

Os valores obtidos foram transferidos para o Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007, onde foi possível gerar curvas de radiopacidade da escala de alumínio e equações matemáticas que permitiram calcular a radiopacidade do defeito ósseo em valores equivalentes de mmAl.

Inicialmente, foi calculado, no programa Excel, a Densidade Óptica Líquida (DOL), que corresponde ao valor do branco (padronizado em 255) menos o valor médio do *pixel*. Esse valor foi obtido tanto a partir das medições realizadas em cada degrau da escala de alumínio (Figura 17A), como nos defeitos ósseos (Figura 17B). Com o DOL obtido de cada degrau, foi gerado um gráfico (Figura 17C).

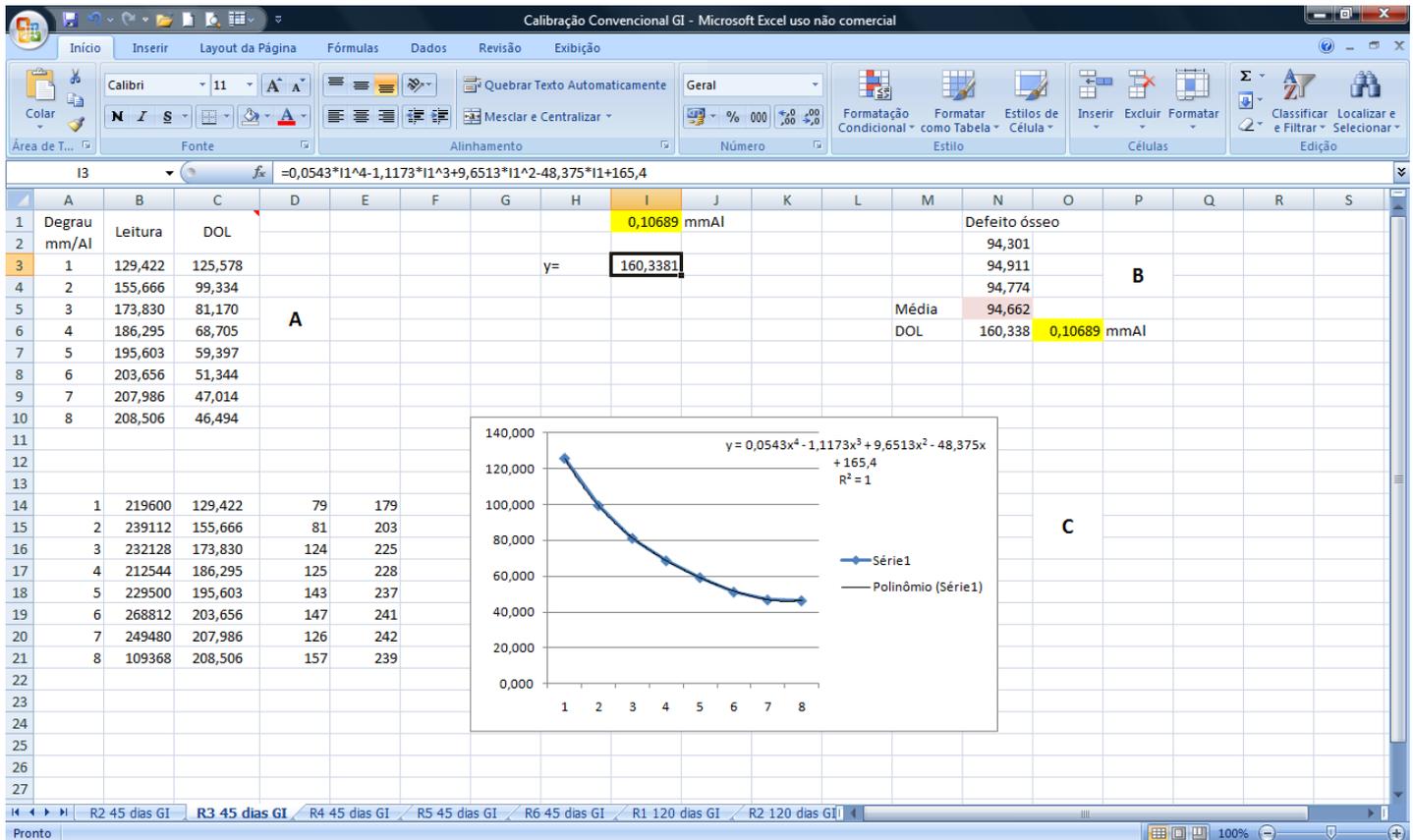


Figura 17 – Análises realizadas no programa Excel para obtenção da DOL e equação matemática para transformação dos valores médios de cinza em mmAl

Selecionou-se, então, a função Linhas de Tendência (Figura 18), pela qual foi possível obter a equação matemática mais adequada para transformação dos valores de *pixel* em mmAl. Foi selecionada, assim, a equação exponencial de quarto grau, já que, nessa situação, a curva passava pelo maior número de pontos, e o valor de  $R^2$  foi o mais próximo de um (Figura 18).

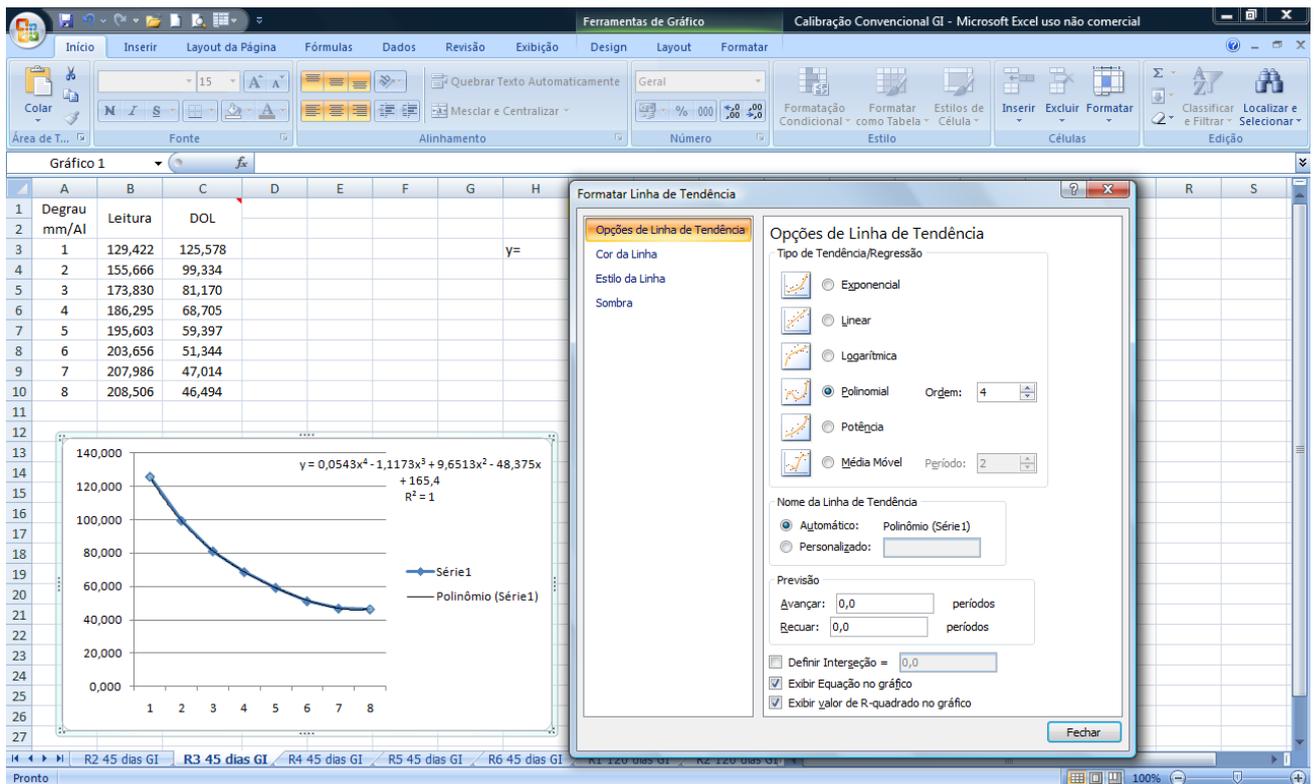


Figura 18 – Seleção da linha de tendência

Em seguida, a DOL do defeito ósseo foi aplicada na equação e, assim, obteve-se seu valor equivalente em mmAl (Figura 17B). Para cada imagem radiográfica foi obtida uma equação matemática diferente, para se realizar a conversão dos valores de pixel em valores equivalentes em mmAl.

#### 4.5.3 Subtração digital

Para a realização dessa análise, foram utilizadas as imagens previamente salvas, que continham apenas a seleção do defeito ósseo. Feito isso, empregou-se a ferramenta de subtração digital (Figuras 19 e 20) e, eletronicamente, o programa procedeu à subtração das imagens dos grupos de teste com as do grupo de controle (Figura 21). Na imagem resultante, um novo ROI circular foi selecionado, e a ferramenta histograma foi aplicada para se obter a média dos valores de *pixel* (Figura 22).

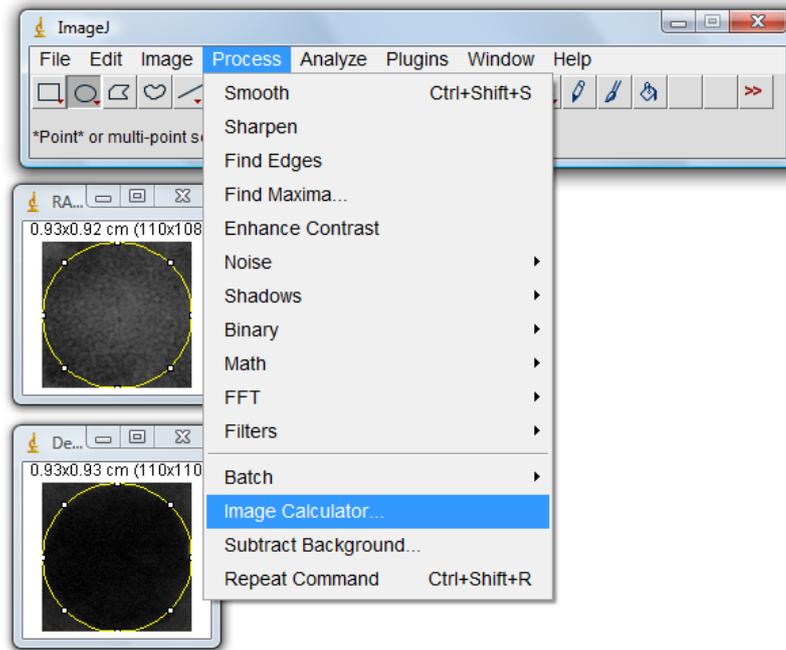


Figura 19 – Seleção da ferramenta cálculo em imagens

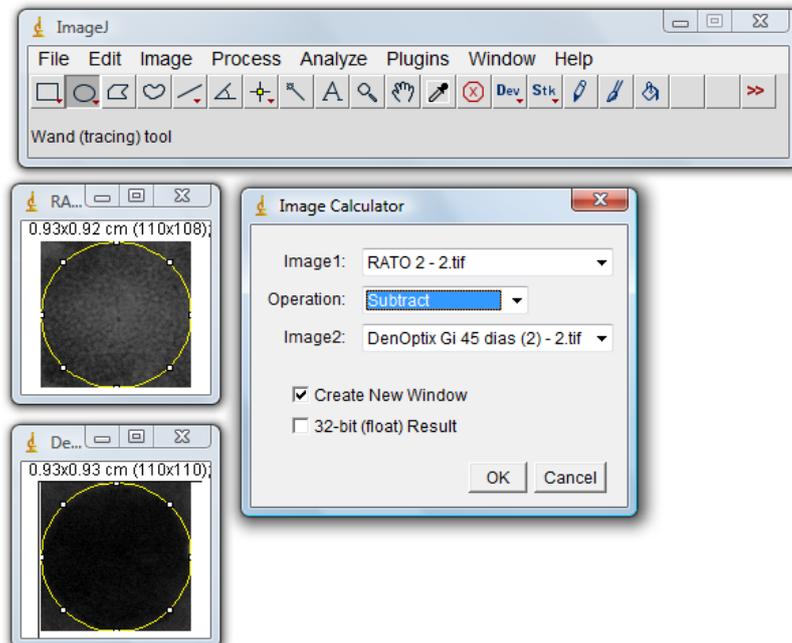


Figura 20 – Seleção da operação subtração

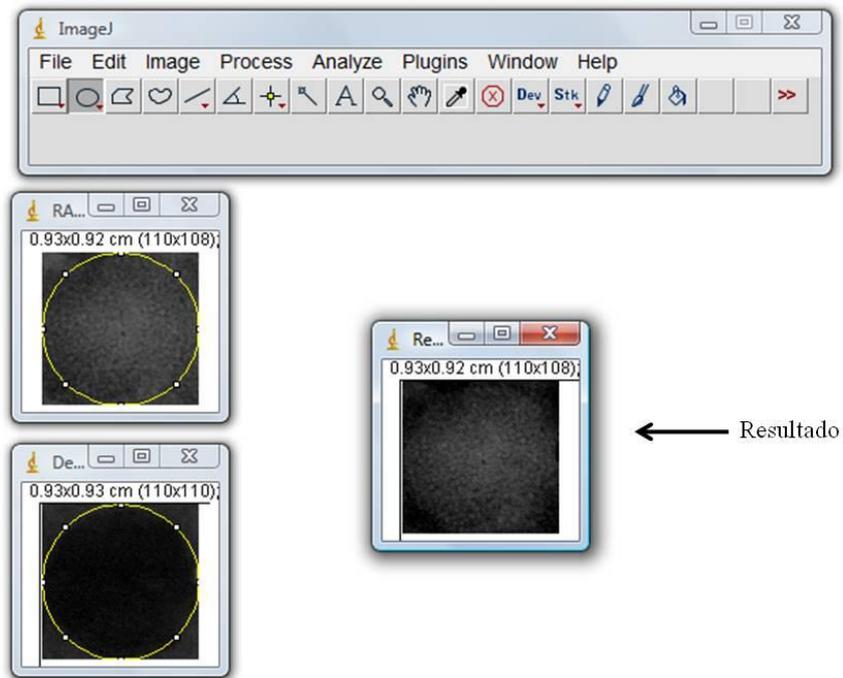


Figura 21 – Imagem resultante da subtração digital

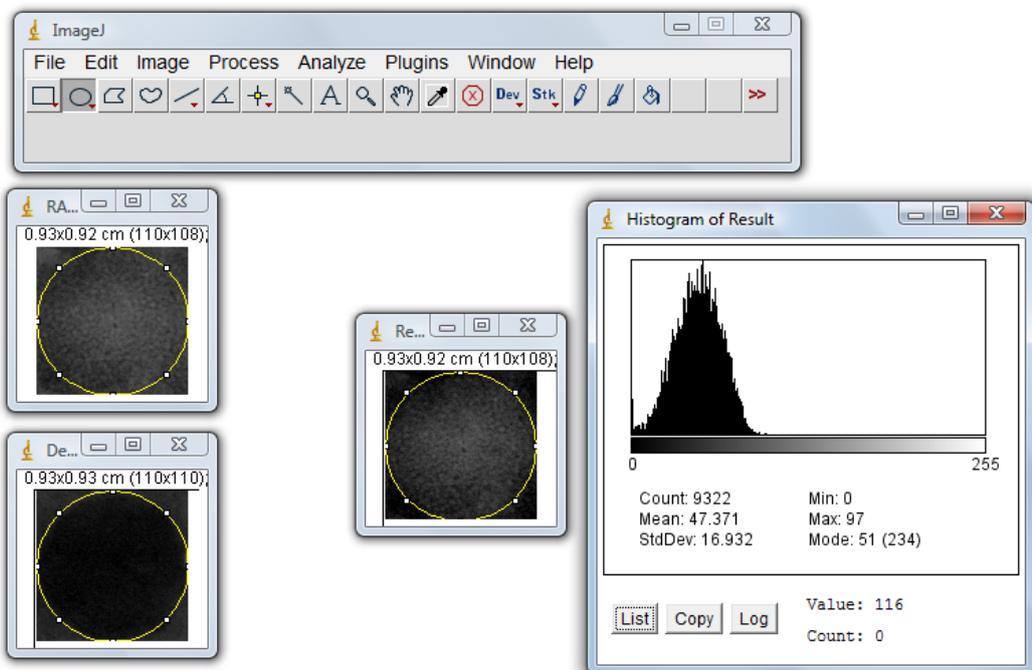


Figura 22 – Média dos valores de *pixels* da imagem resultante, obtida pela ferramenta histograma

Neste trabalho, foi utilizada, como radiografia-controle, a imagem obtida da amostra onde foi realizado apenas um defeito vazio (Grupo CO), sem adição de componentes para proporcionar a regeneração óssea. As imagens dos sete grupos (HA, SF, HA/SF, RE, HA/RE, SF/RE, HA/SF/RE) no tempo biológico de 45 dias foram sobrepostas a essa imagem-controle, para possibilitar a visualização da formação óssea na região, pelo uso de diferentes biomateriais.

#### 4.6 ANÁLISE DOS DADOS

O cálculo amostral foi realizado baseando-se em estudos prévios do nosso grupo, como o estudo realizado por Miguel e colaboradores (2006) e Cardoso e colaboradores (2006). As médias obtidas pelas análises do valor médio do *pixel*, valores equivalentes em mmAl e pela subtração digital foram analisadas pelo teste SMM (*Studentized Maximum Module*). Esse teste é utilizado para simular diferentes condições do experimento. Neste estudo, foi definido como significante valores de  $p \leq 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

Foram analisadas 86 imagens dos nove grupos com 45 dias pós-operatórios, sendo 43 radiografias digitais e 43 convencionais digitalizadas, conforme discrimina a Tabela 2. Dois animais do grupo HA/SF/RE morreram durante o experimento, porém esse fato não comprometeu a análise dos dados.

Tabela 2 – Distribuição das radiografias analisadas de acordo com o grupo experimental e o sistema de imagem

Grupo	Convencional Digitalizado	Digital
<b>CO</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>HA</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>SF</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>HA/SF</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>RE</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>HA/RE</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>SF/RE</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>HA/SF/RE</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>PO</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>43</b>

Fonte: Dados da pesquisa, 2010.

Nas figuras 23 e 24, está incluída uma radiografia de cada grupo, organizadas sequencialmente da seguinte maneira: A- Grupo CO; B- Grupo HA; C- Grupo SF; D- Grupo HA/SF; E- Grupo RE; F- Grupo HA/RE; G- Grupo SF/RE; H- Grupo HA/SF/RE; I- Grupo PO.

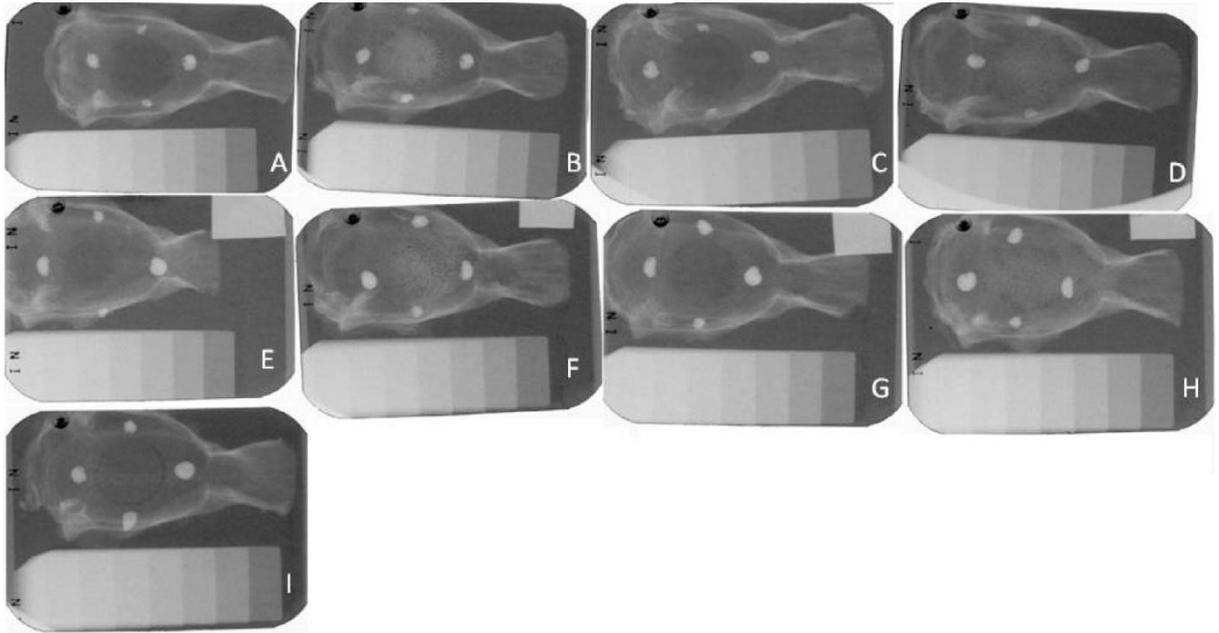


Figura 23 – Radiografias convencionais digitalizadas dos diferentes grupos estudados

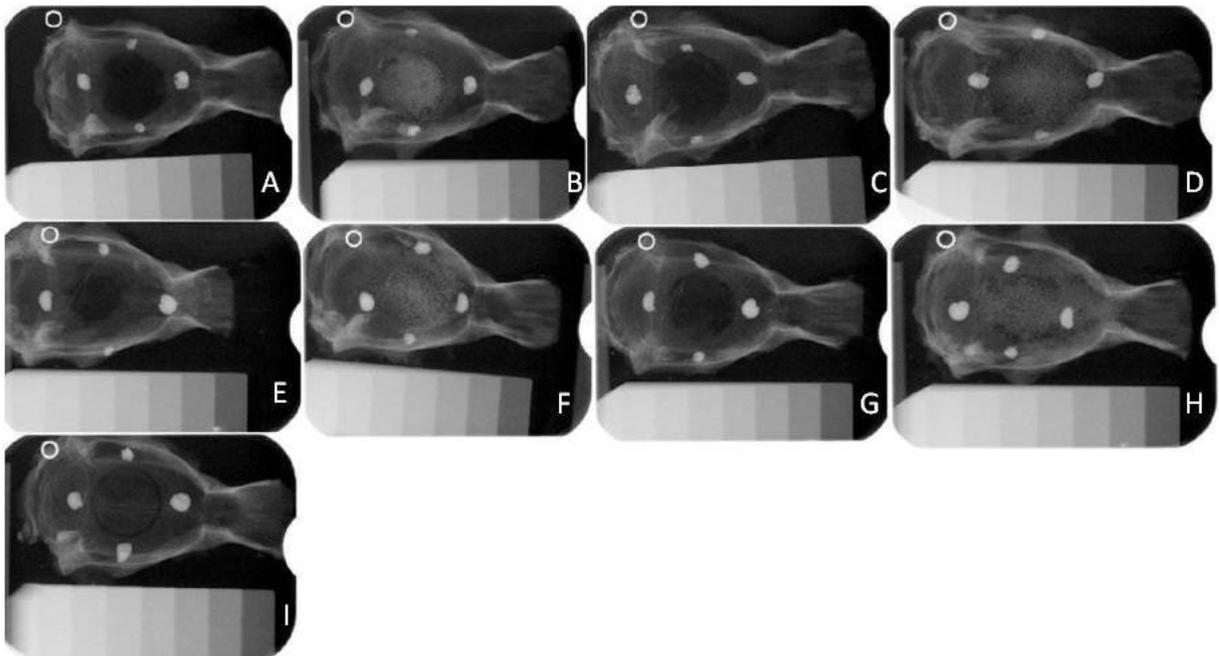


Figura 24 – Radiografias digitais dos diferentes grupos estudados

## 5.1 VALOR MÉDIO DOS *PIXELS*

As médias dos valores de *pixel* medidos nos defeitos ósseos pelos sistemas convencional digitalizado e digital estão listadas na tabela 3. Foi mensurada também a média dos valores de *pixel* da HA pelo sistema convencional digitalizado e pelo sistema digital (Tabela 3). Já o Gráfico 1 evidencia as médias dos valores de *pixel* obtidas pelos diferentes sistemas de imagem.

Tabela 3 – Média dos valores dos *pixels* nos defeitos ósseos no sistema convencional digitalizado e digital

Sistema	Convencional Digitalizado		Digital		
	Grupo	Valor médio do <i>pixel</i> <sup>1</sup>	Desvio padrão	Valor médio do <i>pixel</i> <sup>1</sup>	Desvio padrão
CO		95,766 ab	5,647	20,661 b	5,578
HA		109,234 a	8,069	66,972 a	8,110
SF		80,298 b	4,644	28,894 b	1,985
HA/SF		89,812 b	3,762	50,390 b	9,218
RE		94,334 b	5,903	29,913 b	4,980
HA/RE		111,376 a	4,522	67,540 a	10,726
SF/RE		90,973 b	3,687	31,469 b	1,779
HA/SF/RE		102,049 b	12,371	51,739 b	21,090
PO		91,584 b	5,190	40,612 b	4,946
há		110,196	9,891	54,15	11,889

<sup>1</sup> Médias com letras iguais não diferem entre si  
 Fonte: dados da pesquisa, 2010.

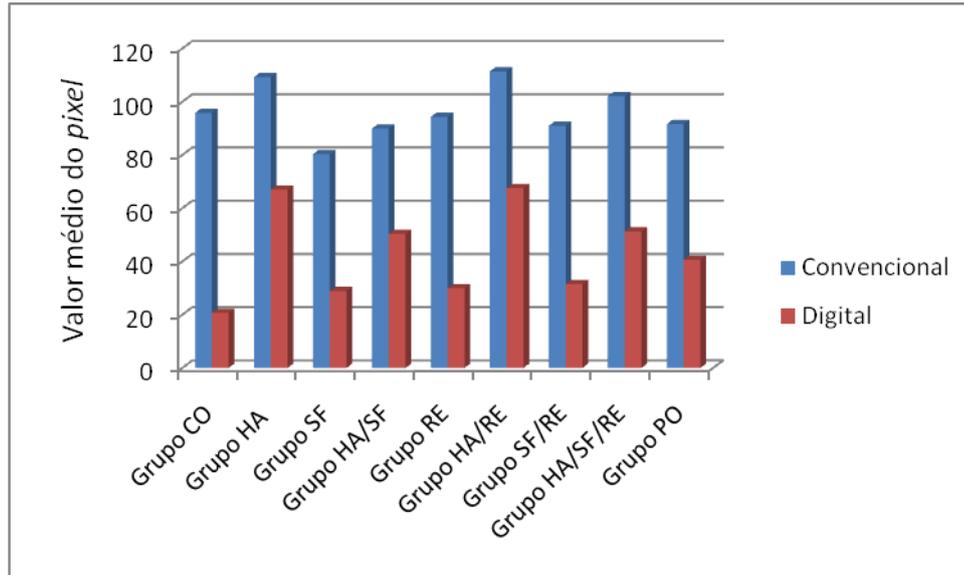


Gráfico 1 – Média dos valores de *pixels* obtidos pelo sistema convencional e pelo sistema digital de imagem, nos diferentes grupos estudados

Em relação à análise das médias dos valores do *pixel* no sistema convencional, os grupos que apresentaram as maiores médias foram os grupos HA e HA/RE, ou seja, aqueles nos quais o defeito ósseo foi preenchido exclusivamente com HA. Já as menores médias foram registradas nos grupos SF, HA/SF, SF/RE e PO ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3). O grupo RE, entretanto, obteve uma média menor do que as dos grupos HA ( $p > 0,05$ ) e HA/RE ( $p \leq 0,05$ ), e semelhante à do grupo CO ( $p > 0,05$ ), sendo que a média desse último não registrou diferença significativa com qualquer dos grupos estudados ( $p > 0,05$ ).

No sistema digital, observou-se um comportamento semelhante para os grupos HA e HA/RE, sendo que essas médias apresentaram diferença significativa com os grupos CO, SF, RE, SF/RE, PO ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3), ou seja, aqueles que apresentaram as médias menores dos valores de *pixel* (Gráfico 1).

O uso de selante de fibrina nos grupos SF e SF/RE proporcionou um aumento na densidade nas imagens digitais, quando comparado aos aumentos dos grupos CO e RE ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3). Entretanto, esse efeito não foi percebido nas imagens convencionais digitalizadas. Ao contrário, observou-se uma diminuição na média dos valores do *pixel* ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

A aplicação simultânea de HA e de selante de fibrina (grupos HA/SF e HA/SF/RE) não promoveu um aumento no valor médio de *pixel* quando comparado ao dos grupos que receberam exclusivamente HA. Pelo contrário, a média dos valores do *pixel* do grupo

HA/SF/RE foi menor do que as médias obtidas nos grupos HA ( $p>0,05$ ) e HA/RE ( $p>0,05$ ), para ambos os sistemas de imagem. Do mesmo modo, a média dos valores do *pixel* do grupo HA/SF foi menor que as médias dos grupos HA ( $p\leq 0,05$ ) e HA/RE ( $p\leq 0,05$ ) para o sistema convencional, enquanto que, no digital, só houve diferença estatística com o grupo HA/RE ( $p\leq 0,05$ ) (Tabela 3).

Em relação ao grupo PO, as médias dos valores do *pixel* encontradas foram de 91,584 para o sistema convencional digitalizado e de 40,612 para as imagens digitais ( $p\leq 0,05$ ) (Tabela 3). Em relação ao primeiro, essa média foi superior à dos grupos SF, HA/SF, SF/RE ( $p>0,05$ ), enquanto que, para o sistema digital, foi maior do que as dos grupos CO ( $p\leq 0,05$ ), SF, RE, SF/RE ( $p>0,05$ ).

A administração sistêmica de ranelato de estrôncio (Grupos RE, HA/RE, SF/RE, HA/SF/RE) não promoveu um aumento na densidade óssea ( $p>0,05$ ), avaliada por ambos os sistemas de imagem (Gráfico 1).

Como apresentado no Gráfico 1, houve uma grande variação entre as médias de *pixels* obtidas pelos sistemas convencional e digital de imagem ( $p\leq 0,05$ ).

## 5.2 VALOR EQUIVALENTE EM MILÍMETROS DE ALUMÍNIO

Ao converter os valores médios de *pixel* em valores equivalentes em mmAl, observou-se que, para ambos os sistemas, houve um comportamento semelhante entre os grupos (Gráfico 2). Os maiores valores foram registrados nos grupos que receberam unicamente HA (Grupos HA e HA/RE), seguidos dos grupos que receberam HA e selante de fibrina (HA/SF e HA/SF/RE), do padrão ouro (PO) e dos que receberam apenas selante de fibrina (SF e SF/RE) e (ou) nos controles (CO e RE) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores correspondentes em mmAl nos sistemas convencional digitalizado e digital

Sistema	Convencional Digitalizado	Digital
Grupo	Valor equivalente em mmAl <sup>1</sup>	Valor equivalente em mmAl <sup>1</sup>
CO	0,085 c	0,104 c

HA	0,622 a	0,799 a
SF	0,118 b	0,273 b
HA/SF	0,324 b	0,399 b
RE	-0,021 c	0,020 c
HA/RE	0,545 a	0,649 a
SF/RE	0,063 b	0,061 b
HA/SF/RE	0,348 b	0,418 b
PO	0,274 b	0,375 b
HA	0,2915	0,2181

<sup>1</sup> Médias com letras iguais não diferem entre si

Fonte: Dados da pesquisa, 2010.

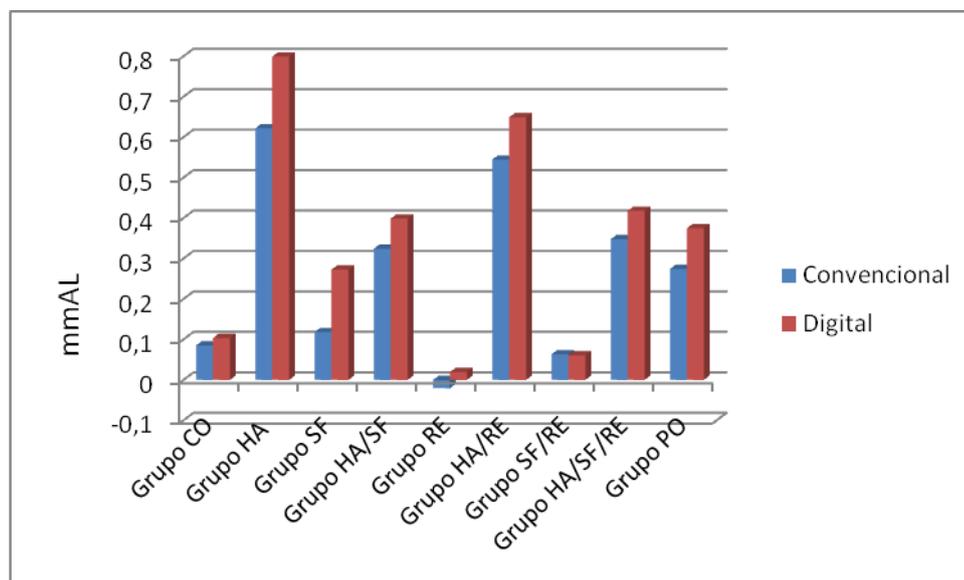


Gráfico 2 – Valores equivalentes em mmAl para os diferentes grupos estudados, pelos sistemas convencional e digital de imagem

O grupo HA registrou os maiores valores, quando comparado aos demais grupos ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença significativa com o grupo HA/RE ( $p > 0,05$ ), para ambos os sistemas de imagem. Apesar do comportamento semelhante, os valores obtidos a partir das radiografias digitais foram maiores do que os obtidos pelas radiografias convencionais digitalizadas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 4).

O grupo PO apresentou valores maiores do que os dos grupos CO ( $p \leq 0,05$ ), SF ( $p > 0,05$ ), RE ( $p \leq 0,05$ ) e SF/RE ( $p > 0,05$ ), ou seja, aqueles nos quais os defeitos foram mantidos vazios ou foram preenchidos com selante de fibrina, com ou sem administração de ranelato de estrôncio. Entretanto, para os grupos onde o defeito ósseo foi preenchido com material radiopaco (HA) (Grupos HA, HA/SF, HA/RE, HA/SF/RE), os valores equivalentes

em mmAl foram maiores do que os do grupo PO. Entretanto, só houve diferença estatística entre o grupo PO e os grupos HA e HA/RE ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 4).

A administração do ranelato de estrôncio levou a uma diminuição nos valores equivalentes em mmAl (Gráfico 2). Entretanto, não se observou diferença estatística entre os grupos pareáveis ( $p > 0,05$ ) (CO e RE, HA e HA/RE, SF e SF/RE, HA/SF e HA/SF/RE).

### 5.3 SUBTRAÇÃO DIGITAL

Os resultados obtidos pela subtração digital das imagens foram expressos também em valores médios dos tons do *pixel*. Esses valores estão relacionados na Tabela 5 e no Gráfico 3.

Tabela 5 – Média dos valores dos *pixels* obtida pelo sistema convencional digitalizado e pelo sistema digital para os diferentes grupos estudados, após a subtração digital

Grupo	Convencional Digitalizado	Desvio padrão	Digital	Desvio padrão
HA	15,294 a A	2,968	46,691 a B	11,909
SF	1,293 a A	1,430	9,521 c A	5,545
HA/SF	4,063 a A	2,337	30,704 b B	11,835
RE	5,362 a A	3,859	10,617 c A	5,486
HA/RE	17,173 a A	5,757	47,35 a B	11,073
SF/RE	3,771 a A	2,057	11,628 c A	4,397
HA/SF/RE	13,383 a A	8,371	34,119 b B	15,032

<sup>1</sup> Média com letras iguais não diferem entre si. Letras minúsculas correspondem às colunas, maiúsculas referem-se às linhas.

Fonte: Dados da pesquisa, 2010.

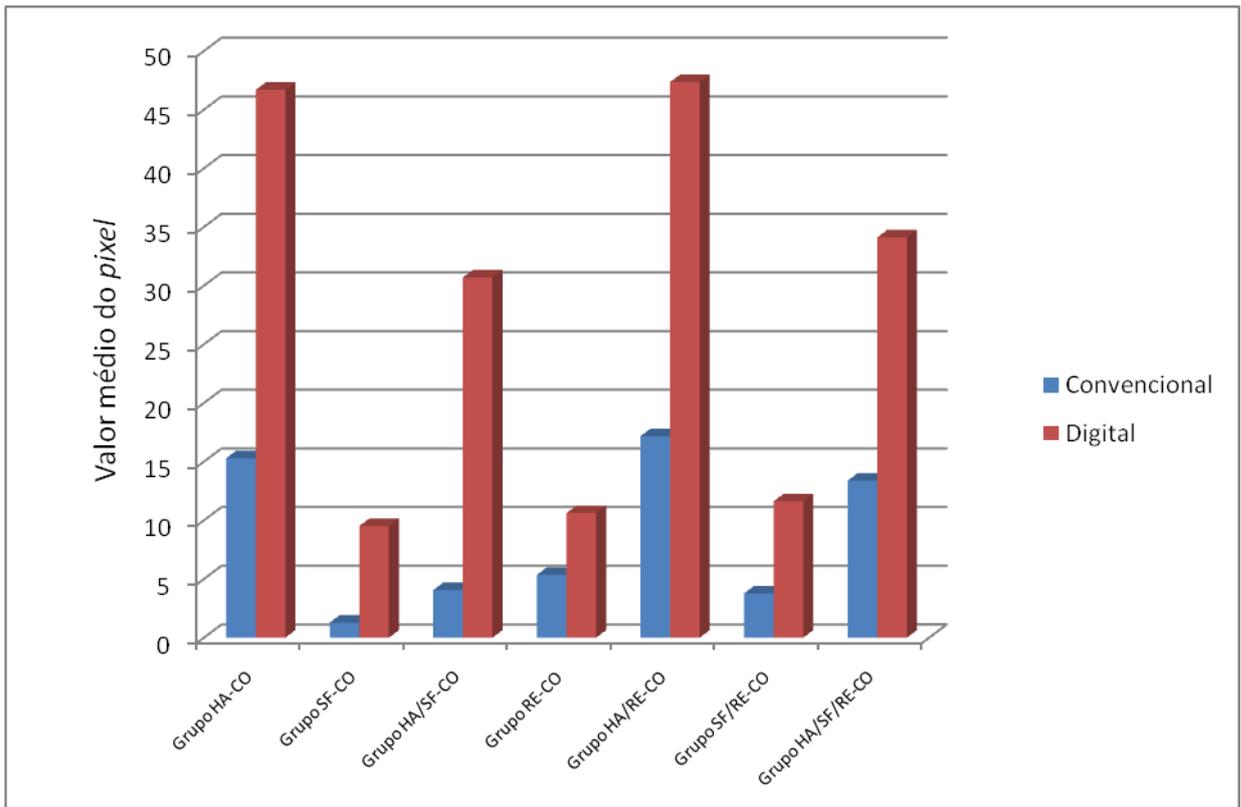


Gráfico 3 – Média dos valores dos *pixels* obtida pelo sistema convencional e pelo sistema digital para os diferentes grupos estudados, após a subtração digital

As maiores médias dos valores do *pixel* foram observadas nos grupos HA e HA/RE para ambos os sistemas, seguidas pelas grupos HA/SF e HA/SF/RE. Entretanto, no sistema convencional digitalizado, não houve diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ). Já nas radiografias digitais, as médias dos grupos HA e HA/RE foram estatisticamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) do que as dos grupos SF, HA/SF, RE, SF/RE e HA/SF/RE. Do mesmo modo, os grupos HA/SF e HA/SF/RE apresentaram médias maiores do que as dos grupos SF, RE e SF/RE ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 5).

Ao comparar os grupos que receberam ranelato de estrôncio associado a outros biomateriais (Grupos HA/RE, SF/RE, HA/SF/RE) com os seus correspondentes que não receberam essa medicação (Grupos HA, SF e HA/SF), não se observou diferença estatística entre as médias dos valores de *pixel* após a subtração digital ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5). Entretanto, a subtração do grupo RE com o grupo I registrou um aumento na média dos valores de *pixel* (Gráfico 3)

Ao analisar comparativamente os resultados obtidos pelos diferentes sistemas de imagem (convencional digitalizado e digital) (Gráfico 3), observou-se que, para os grupos SF, RE e SF/RE, não houve diferença estatística entre as médias ( $p > 0,05$ ). Já para os grupos HA, HA/SF, HA/RE e HA/SF/RE houve diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ).

## **6 DISCUSSÃO**

O exame radiográfico é um método adequado na avaliação de alterações ósseas e na preservação de tratamentos que envolvem neoformação e reparo de tecidos mineralizados, e, por isso, foi selecionado como método de avaliação neste estudo. Em casos de defeitos ósseos críticos, o uso de biomateriais deve estimular a formação tecidual, e esse processo pode ser observado por imagens radiográficas, devendo ser possível distingui-lo da matriz óssea formada.

Desse modo, o osso neoformado deve possuir características ideais, semelhantes às do osso normal, tais como: propriedades mecânicas adequadas; boa arquitetura e grau de mineralização da matriz óssea; estrutura e química dos cristais ósseos semelhantes às do tecido hígido; e propriedades de remodelação adequadas (SHAPURIAN *et al.*, 2006).

Entretanto, os biomateriais e os métodos de avaliação devem ser testados previamente em modelos animais, como realizado neste estudo, para que possam, posteriormente, ser aplicados clinicamente em seres humanos. A seleção do modelo animal deve levar em consideração os princípios dos 3Rs (*Replacement, Refinement, Reduction*) (RUSCHE, 2003).

Portanto, para estudar *in vivo* a ação dos biomateriais desenvolvidos a partir de princípios da bioengenharia tecidual, na regeneração óssea em defeito crítico, é possível utilizar diversos modelos animais. Apesar das limitações inerentes ao uso do modelo animal de pequeno porte, suas vantagens compensam o seu uso. Alguns estudos, realizados em ratos, utilizaram defeitos críticos confeccionados em mandíbula (SAADEH *et al.*, 2001) e, principalmente, na região da calvária (BURASTERO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2006; INTINI *et al.*, 2008; MARINS *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2009; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006; YUN *et al.*, 2010), assim como neste estudo. Embora seja possível confeccionar mais de um defeito ósseo no mesmo animal, para animais de médio e grande porte (LEE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010a,b), a opção pelos animais de pequeno porte está relacionada aos baixos custos para sua aquisição, criação e manutenção, quando comparados aos animais de grande porte. Além disso, esses animais não exigem grandes espaços físicos para sua manutenção e o tempo necessário para que ocorra a regeneração óssea é curto (HOLSTEIN *et al.*, 2009).

Para o presente estudo, optou-se por utilizar o sítio em calvária, devido à facilidade de acesso a essa região, estabilidade e baixo risco de complicações (KOCHI *et al.*, 2009). Outro fator importante que se considerou foi à possibilidade de avaliação do tecido ósseo por exames radiográficos. Para isso, foi necessário padronizar alguns fatores que interferem na obtenção da imagem radiográfica, como posicionamento do animal ou espécime e a distância

entre foco e filme, o que foi possível com o uso de posicionadores radiográficos adaptados para estudos em animais.

Nos modelos que envolvem animais de pequeno porte, como os ratos, a avaliação do tecido ósseo pode ser observada em diversos tempos biológicos, pela realização de radiografias *post mortem* das calvárias. Entretanto, isto demanda um maior número de animais utilizados pela pesquisa, uma vez que uma determinada quantidade de animais será eutanasiada em tempos biológicos distintos. As calvárias, devido às suas dimensões, são facilmente adaptadas em posicionadores radiográficos, exigindo películas radiográficas pequenas, como as utilizadas neste estudo, que são indicadas para as tomadas radiográficas intraorais. Além disso, o aparelho de radiação X selecionado pode ser também utilizado para as tomadas radiográficas intraorais, pois, dentre outras vantagens, possui um braço flexível, o que facilita o posicionamento e a realização das radiografias, não necessitando de grandes espaços físicos para sua instalação. Já nos modelos animais de grande porte, essa avaliação periódica pode ser realizada *in vivo*. Entretanto, as tomadas radiográficas dificilmente serão padronizadas, uma vez que, apesar de os animais estarem anestesiados, a confecção e o uso de posicionadores radiográficos é mais difícil, e, para a realização das imagens, há necessidade de filmes radiográficos maiores e aparelhos mais potentes.

Além disso, como as imagens radiográficas correspondem a projeções em duas dimensões de estruturas tridimensionais, a avaliação das calvárias está livre de sobreposições de outras estruturas anatômicas, como pode ser observado nas radiografias obtidas neste estudo. Entretanto, quando essa avaliação é realizada *in vivo*, pequenas alterações na angulação do animal, no filme ou no aparelho de radiação X podem levar a uma imagem final com sobreposições.

Dentre os métodos radiográficos disponíveis, optou-se por utilizar radiografias convencionais digitalizadas e digitais na avaliação da formação óssea pelo uso de biomateriais, já que é possível empregar ferramentas de manipulação de imagem que contribuem no diagnóstico e no acompanhamento de tratamentos. Além de outras vantagens, a informatização facilita a comunicação entre o radiologista e o profissional, assim como entre ele e o paciente.

Contudo, apesar de constituírem métodos adequados ao diagnóstico, observamos que houve diferença na média dos valores de *pixel* entre os métodos. Esse fato pode ser explicado pelo ruído produzido na imagem, que pode ser gerado por imprecisões na sua aquisição que limitam o número real de densidades significativas capturadas (WHITE; PHAROAH, 2007).

Ele pode ainda estar relacionado com o tempo de exposição selecionado para obtenção da imagem, assim como com o processo de digitalização de radiografias convencionais.

Quanto menor o tempo de exposição utilizado para a obtenção da imagem, maior a presença de ruído (BERKHOUT *et al.*, 2004). Desse modo, o tempo de exposição selecionado neste trabalho (0,125s) pode ter contribuído na formação do ruído na imagem e, conseqüentemente, na diferença entre as médias dos valores de *pixel*. Vale ressaltar que a seleção do tempo de exposição para este trabalho foi realizado em um estudo-piloto, no qual radiologistas com experiência optaram pelas imagens obtidas com um menor tempo de exposição para a avaliação do tecido ósseo. Entretanto, as imagens convencionais foram apresentadas aos profissionais em negatoscópios, e não no formato digital. Já foi demonstrado que as imagens convencionais são superiores às suas equivalentes digitalizadas, seja por câmeras digitais ou *scanners* com leitor de transparência, quanto à qualidade de diagnóstico (GOGA; CHANDLER; LOVE, 2004). Uma vez que o processo de digitalização, também, pode ser responsável pelo ruído. Essas características em conjunto corroboram os resultados obtidos neste estudo, no qual se observou que as imagens digitais conseguiram detectar alterações mais sutis na densidade do que as digitalizadas. Ferreira e colaboradores (2006) acrescentaram que o ruído interfere na qualidade de imagem e, por estar presente nas radiografias digitalizadas, é, possivelmente, o responsável pela inferioridade desse método, quando comparado ao das radiografias digitais.

Todos os espécimes foram radiografados, em média, após quatro dias da eutanásia, tempo correspondente ao transporte do material de um centro de estudo para outro. Nesse período, ficaram submersos em uma solução de formol tamponado a 4%. Esse período de tempo não foi suficiente para promover alterações na densidade óptica (média dos valores do *pixel*) da imagem radiográfica, já que, do dia 1 ao dia 15 após imersão, não há diferença nesse valor (FONSECA *et al.*, 2008).

Nas radiografias convencionais digitalizadas e digitais, os grupos que apresentaram as maiores médias dos valores do *pixel* e em valores equivalentes em mmAl foram os que receberam HA como biomaterial para estimular a formação óssea, independentemente da administração do ranelato de estrôncio e do uso do selante de fibrina. Porém isso não significa, necessariamente, que tais grupos estimularam a maior formação óssea, e sim que possivelmente a radiopacidade da HA contribuiu para as altas médias dos valores dos *pixels* encontrados, uma vez que elas foram superiores às observadas para o grupo padrão ouro, no qual se mediu a densidade do osso hígido.

A média dos valores do *pixel* obtida para a HA foi realizada previamente à inserção no defeito ósseo, ou seja, essa média representou a densidade da HA antes de sofrer interação com o sistema imuno-inflamatório. Este valor obtido para a HA foi semelhante ao do biomaterial BioOss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça), que é um derivado de osso bovino (TRÉ *et al.*, 2006).

Ao entrar em contato com os fluídos biológicos, a HA tende a sofrer solubilização, o que levaria a uma diminuição na sua densidade radiográfica, pois, após seis semanas de implantação, esse processo já é observado (WENISCH *et al.*, 2003). Desse modo, aos 45 dias, a HA já deve ter sofrido algum processo de solubilização. Como nas imagens digitais a média dos valores dos *pixels* dos grupos HA e HA/RE foi maior do que a da HA pura, é provável que, nesses grupos, já existisse alguma formação de matriz óssea. Entretanto, esse efeito não foi observado nas imagens convencionais digitalizadas. Apesar da facilidade em distinguir as microesferas de HA em imagens radiográficas (WANG *et al.*, 2003), a sua radiopacidade pode dificultar o acompanhamento da formação óssea (ABIRAMAN *et al.*, 2002; ZHUKAUSKAS *et al.*, 2010; YUN *et al.*, 2010), o que justifica os achados aqui apresentados. Entretanto, a sua osteocondutividade e a sua capacidade de servir de suporte para a formação de novo osso podem acelerar o processo de regeneração tecidual (PARK *et al.*, 2009).

Nos grupos HA/SF e HA/SF/RE, além da HA, foi adicionado também o selante de fibrina, no intuito de testar se ele garantiria uma maior estabilidade das microesferas de HA no sítio com defeito crítico (CHEN *et al.*, 2009). Apesar de o selante de fibrina, quando associado a biocerâmicas, apresentar boa capacidade osteocondutora (JEGOUX *et al.*, 2005), os resultados mostraram uma menor média nos valores do *pixel* e em valores equivalentes em mmAl nos grupos nos quais foram adicionados agentes aglutinantes, quando comparados com os que receberam apenas HA. Porém, só foi observada diferença estatística quando os valores em equivalentes de mmAl foram avaliados. Esse efeito pode ser explicado pelo fato de o selante de fibrina ter preenchido um espaço no defeito ósseo e, como não possui radiopacidade como a HA, proporcionou uma menor média dos valores do *pixel*. Outra possível explicação pode estar relacionada ao fato de o selante não ter retido, de forma efetiva, as microesferas no sítio. Do mesmo modo, o selante de fibrina pode ter acelerado o processo de reabsorção da HA (JEGOUX *et al.*, 2005), diminuindo a sua radiopacidade, ou mesmo a formação óssea a partir dessa associação pode ocorrer mais tardiamente (ABIRAMAN *et al.*, 2002).

As menores médias dos valores de *pixel* e valores equivalentes em mmAl foram observadas nos grupos CO, SF, RE e SF/RE, ou seja, naqueles em que o defeito ósseo foi

mantido vazio ou preenchido com selante de fibrina, independentemente do uso do ranelato de estrôncio. Para as radiografias digitais, os grupos que apresentaram as menores médias entre as duas análises (média de valores de *pixels* e valores equivalentes em mmAl) foram os grupos CO e RE, embora não tenha havido diferença significativa dos grupos onde o defeito foi preenchido com selante de fibrina. A atuação do selante de fibrina na cicatrização de fraturas e na formação óssea ainda é um assunto controverso (LE GUÉHENNEC; LAYROLLE; DACULSI, 2004). Já foi mostrado que quando aplicado isoladamente no defeito, não promoveu formação de tecido ósseo (PERKA *et al.*, 2000).

Nas imagens digitalizadas, observou-se um comportamento diferente, ou seja, as menores médias foram observadas nos grupos onde o defeito foi preenchido com selante de fibrina. Como o ruído, nessas imagens, pode interferir no seu poder de diagnóstico (FERREIRA *et al.*, 2006), e como esse agente aglutinante não possui radiopacidade e a reação tecidual produzida por ele não pode ser observada, provavelmente não foi possível detectar, com ferramentas de análise de imagem, a densidade da fibrina.

Já a administração sistêmica de ranelato de estrôncio não levou a um aumento na média dos valores do *pixel* e, conseqüentemente, a um aumento na densidade óssea. Corroborando nossos achados, Cebesoy e colaboradores (2007), ao avaliarem radiográfica e histologicamente a cicatrização de fraturas ósseas, concluíram que o uso do ranelato de estrôncio por quatro semanas não contribuiu nesse processo. Entretanto, esses resultados estão em discordância com outros já publicados (AMMANN *et al.*, 2004; HABERMANN *et al.*, 2010; OZTURAN *et al.*, 2011). Contudo, um único animal do grupo RE destacou-se dos demais, pela formação de matriz óssea que ocupava uma grande área do que antes correspondia a um defeito ósseo.

Como o estrôncio é incorporado apenas à HA do osso recém-formado (LI, C. *et al.*, 2010) e, aos 45 dias pós-operatórios, a formação óssea restringe-se às bordas do defeito (BARRETO, 2008), esse efeito pode não ter sido suficiente para promover um aumento na densidade óssea radiográfica.

A sua ação sobre o metabolismo ósseo é dose-dependente (VERBECKMOES; DE BROE; D'HAESE, 2003). Dessa forma, a incorporação de estrôncio no osso aumenta com a elevação da dose administrada. Porém, em doses elevadas, a concentração de estrôncio no osso tende a atingir um platô de saturação, efeito que é observado após 10 dias de administração de uma dose de 255mg/kg/dia em ratos *Wistar*. Isso ocorre devido a uma saturação na absorção gastro-intestinal do estrôncio (DAHL *et al.*, 2001).

Doses elevadas, como as de 20 e 100µg/ml, podem estar relacionadas ainda com uma mineralização deficiente, devido a uma interferência na diferenciação osteoblástica, na formação da HA e, conseqüentemente, do osso (VERBECKMOES; DE BROE; D'HAESE, 2003). Efeitos adversos, como a osteomalacia, também, já foram relatados (VERBECKMOES *et al.*, 2004).

A dose terapêutica de ranelato de estrôncio em seres humanos é de 2g/dia, o que corresponde a uma concentração plasmática de estrôncio de cerca de 10 a 15µg/ml (VERBECKMOES *et al.*, 2004). Ou seja, para chegar a uma dose de 20 ou 100µg/ml, deve-se ultrapassar a dose terapêutica. Já foi demonstrado também que doses entre 625mg/kg/dia a 900mg/kg/dia, em ratos, corresponde à dose terapêutica em humanos (AMMANN *et al.*, 2004).

Neste trabalho, optou-se por uma dose de 900mg/kg/dia, com base em estudo prévio realizado por Ammann e colaboradores (2004), os quais, ao administrar a medicação misturada na ração, observaram um aumento da massa óssea, sem a produção de efeitos adversos em ratos *Fischer*. Em um estudo-piloto que realizamos, no qual essa medicação foi administrada na mesma concentração, por via oral, porém dissolvida em água, não foi possível observar aumento da densidade óssea radiográfica, e as doses plasmáticas não atingiram um patamar semelhante ao encontrado por Ammann e colaboradores (2004). Por isso, neste estudo, a opção foi misturar a medicação na ração dos animais.

A redução nos valores observados pela análise dos valores equivalentes em mmAl pode ser explicada, então, pelo mecanismo de ação do estrôncio no organismo. Por exemplo, o uso de uma dose equivalente a 2g/dia de ranelato de estrôncio promove, após 72h, *in vitro*, um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina que é um marcador inicial da diferenciação de células precursoras de osteoblastos (BRENNAN *et al.*, 2009). Entretanto, após oito semanas de uma administração de baixas doses de estrôncio é possível observar a sua incorporação ao osso, embora não haja aumento da síntese de matriz óssea (GRYNPAS *et al.*, 1996). O que pode estar relacionado ao mecanismo de incorporação do estrôncio ao osso, o qual ocorre por dois mecanismos: um inicial onde o estrôncio é rapidamente incorporado ao osso e que depende da atividade osteoblástica; e uma segunda etapa na qual o estrôncio é incorporado lentamente (DAHL *et al.*, 2001). Deste modo, é possível que, aos 45 dias pós-operatórios, não tenha havido uma contribuição na formação óssea e provavelmente com um uso contínuo da medicação, em um ponto biológico mais longo, ocorra uma maior formação óssea, detectável por ferramentas de análise de imagem. Já que, com 120 dias pós-operatórios, por exemplo, já há um aumento na deposição de matriz óssea em ratos *Wistar* (BARRETO,

2008). Provavelmente a contribuição do estrôncio na formação óssea ocorra em longo prazo, uma vez que ao avaliar, histológica e radiograficamente, a cicatrização de fraturas após quatro e oito semanas, observou-se que com oito semanas o osso era mais maduro e mineralizado, e radiograficamente, apresentava-se mais radiopaco do que com quatro semanas (LI, Y.F. *et al.*, 2010).

A neoformação óssea em defeito crítico foi avaliada também por meio da subtração radiográfica digital. Essa técnica foi proposta para detectar alterações mínimas no tecido ósseo (TRÉ *et al.*, 2006), indistinguíveis ao olho humano (VAN DER STELT, 2008). Entretanto, para que exerça sua função, é essencial que as radiografias periódicas tenham a mesma geometria, contraste e densidade (CARNEIRO *et al.*, 2009; NICOPOULOU-KARAYIANNI *et al.*, 2002; TRÉ *et al.*, 2006). Por isso, a padronização proposta neste estudo, com o uso de um posicionador de acrílico e a colocação do espécime em cera utilidade, possibilitou a realização de radiografias sequenciais padronizadas. Além disso, utilizou-se um único aparelho de radiação X para a aquisição das imagens, uma única placa de armazenamento de fósforo e filmes radiográficos do mesmo lote de fabricação.

Desse modo, foi possível detectar alterações na média dos valores do *pixel* entre as radiografias dos grupos de teste (grupos HA, SF, HA/SF, RE, HA/RE, SF/RE e HA/SF/RE) e as do grupo de controle (grupo CO). As maiores diferenças foram observadas, novamente, nos grupos que receberam como material de preenchimento a HA, o que pode ser justificado tanto pela maior radiopacidade desse biomaterial (ABIRAMAN *et al.*, 2002; ZHUKAUSKAS *et al.*, 2010; YUN *et al.*, 2010), como por uma provável formação óssea nesses grupos.

Apesar de ambos os métodos de imagem testados terem detectado uma maior média dos valores de *pixels* nos grupos HA e HA/RE, apenas o sistema digital demonstrou diferenças significativas com os demais grupos. Observou-se também que esse sistema mostrou maiores diferenças entre os grupos analisados do que o sistema convencional digitalizado. Entretanto, quando foram comparadas as médias obtidas por esses dois grupos, só houve diferença significativa entre as imagens resultantes da subtração dos grupos HA, HA/SF, HA/RE e HA/SF/RE, ou seja, naqueles com preenchimento de HA. Provavelmente, isso se deve a uma melhor acurácia do sistema digital em detectar diferenças na radiopacidade das imagens resultantes.

No sistema convencional digitalizado, não houve diferença significativa entre as médias obtidas nos grupos testados, tal como foi observado por Guimarães e colaboradores (2010). Apesar de já ter sido demonstrado que ambos os métodos de imagem têm um comportamento semelhante para detectar alterações na mineralização do esmalte, quando

avaliada a acurácia de diagnóstico, o sistema digital é estatisticamente superior ao convencional digitalizado (HAITER-NETO *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006). Isso pode ser explicado pela presença do ruído nas imagens convencionais digitalizadas, o que pode comprometer a qualidade de diagnóstico (FERREIRA *et al.*, 2006).

Do mesmo modo como observado para outros métodos quantitativos de análise da formação óssea, o uso do ranelato de estrôncio não proporcionou um aumento significativo nas médias dos valores do *pixel* após a subtração. Entretanto, a imagem resultante da subtração do grupo RE com o grupo CO levou a um aumento na média dos valores do *pixel*. Provavelmente o animal do grupo RE, como abordado anteriormente, foi o responsável por esse efeito.

O uso do selante de fibrina proporcionou um aumento na média dos valores do *pixel* nas imagens digitais, enquanto que, nas convencionais digitalizadas, apenas uma discreta diferença foi observada. Isso ocorreu porque, apesar de a fibrina não possuir uma densidade significativa, ela causa uma pequena atenuação pelos feixes de radiação X. Mais uma vez, o sistema digital destacou-se por detectar alterações mínimas de densidade radiográfica, assim como verificado nos trabalhos de Haiter-Neto e colaboradores (2005) e Ferreira e colaboradores (2006), em relação à lesão cariiosa em esmalte.

A quantificação do osso neoformado em modelos experimentais de defeito ósseo é um grande desafio (SCHÖNBERGER *et al.*, 2007). Alguns estudos definiram métodos qualitativos ou semiquantitativos para a avaliação desse tecido, por meio da aplicação de escores às imagens (CHEN *et al.*, 2009; DODDS *et al.*, 2010; OZTURAN *et al.*, 2011; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006; SARKAR *et al.*, 2006). Entretanto, esse tipo de avaliação está sujeito a alguns vieses, dentre eles a influência da resolução da imagem (PETRI ARONIN *et al.*, 2009) e o fato de que pequenas alterações ósseas, relacionadas ao ganho ou à perda de mineral, podem ser indistinguíveis ao olho humano (CARVALHO *et al.*, 2009) e podem sofrer uma grande interferência do avaliador (SCHÖNBERGER *et al.*, 2010). Como a avaliação é subjetiva, ela leva em consideração critérios pessoais. Por isso, pode ocorrer uma grande variabilidade entre as avaliações realizadas por diferentes observadores. Ela não permite uma avaliação precisa do tecido ósseo (BELTRAME *et al.*, 2005) e, assim, pode apresentar uma baixa acurácia de diagnóstico quando comparada às avaliações com métodos mais sensíveis, como o exame histopatológico (PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006). Desse modo, optou-se pela utilização de métodos quantitativos para avaliar a formação óssea em um modelo animal de defeito ósseo crítico.

Os métodos quantitativos levam em consideração avaliações objetivas realizadas por *softwares* de computador e, por isso, critérios pessoais de avaliação são minimizados. Dentre eles, podem-se citar a análise das médias dos valores do *pixel* e a subtração digital.

A análise da média dos valores do *pixel* já foi aplicada em outros estudos que envolviam defeitos ósseos (BELTRAME *et al.*, 2005; NIEMEYER *et al.*, 2010a,b; YUN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010b), com o objetivo de quantificar a deposição contínua do tecido ósseo nesses sítios. Neste estudo foi observado que as maiores médias estavam relacionadas aos grupos que receberam um material radiopaco de preenchimento, enquanto que as menores médias foram observadas nos grupos onde o defeito foi mantido vazio ou com preenchimento de selante de fibrina.

É válido ressaltar que os métodos de avaliação da regeneração óssea devem ter um baixo custo, devem ser de fácil interpretação e de fácil acesso à população. Deste modo, Beltrame e colaboradores (2005) e Schönberger e colaboradores (2007) desenvolveram métodos radiográficos quantitativos de análise da formação óssea, os quais se mostraram adequados, de fácil uso e interpretação, independentemente do modelo animal utilizado (SCHÖNBERGER *et al.*, 2007).

Ambos os métodos são baseados na seleção de uma região de interesse. Nessa etapa, pode ocorrer uma despadronização, ou seja, cada avaliador pode selecionar uma área com diâmetros diferentes. Por isso, definiu-se, neste estudo, um ROI padronizado de cerca de 9mm. Outra maneira adequada de avaliação da imagem seria pela conversão das médias de *pixel* em valores equivalentes em mmAl. Isso é possível em função de a escala de alumínio possuir um número atômico similar ao do osso e, assim, a atenuação dos feixes de radiação X ocorrer de maneira semelhante (SOUTHARD *et al.*, 1999). Por meio dessa análise, observamos que, apesar da radiopacidade do biomaterial utilizado, os valores encontrados foram inferiores a 1,0mmAl, o que pode ser explicado pela fina espessura óssea da calvária (YUN *et al.*, 2010). Também foi possível detectar alterações sutis da densidade radiográfica, não-observadas pela média dos valores do *pixel*, uma vez que alterações súbitas da densidade óssea podem se tornar imprevisíveis quando os tons de cinza do *pixel* não se comportam de maneira linear (TRÉ *et al.*, 2006). Desse modo, a escala funciona como uma referência interna que possibilita corrigir variações resultantes das condições de exposição e processamento das imagens (SOUTHARD *et al.*, 1999). Ela pode ser utilizada também quando não é possível garantir uma padronização dos fatores que interferem na formação da imagem (TRÉ *et al.*, 2006).

Apesar do controle realizado neste estudo para garantir uma padronização na obtenção das imagens radiográficas, o uso da escala de alumínio possibilitou uma maior linearidade entre os resultados. Isso pode ser exemplificado pela inversão no comportamento dos sistemas convencional digitalizado e digital. Enquanto que na análise das médias dos valores de *pixel*, o sistema convencional digitalizado apresentou as maiores médias, quando esses valores foram convertidos para mmAl, o sistema digital passou a ter as maiores médias. Entretanto, a ordem dos grupos que apresentaram as maiores médias para os que apresentaram as menores foi igual para ambos os métodos de imagem (BAKSI; SEN; EYUBOGLU, 2008).

Já a subtração digital é uma ferramenta de grande importância na detecção de alterações sutis do tecido ósseo, assim como, na sua quantificação (TRÉ *et al.*, 2006). Neste estudo, houve uma correspondência entre os grupos que apresentaram as maiores médias de *pixels* com aqueles resultantes da subtração digital. O que mostra que ambos os métodos são adequados para avaliar alterações de densidade nos defeitos ósseos críticos, apesar de a radiografia digital ter tido um comportamento superior ao da radiografia convencional digitalizada.

Desse modo, este trabalho possibilitou validar uma técnica de análise da radiopacidade óssea por imagens radiográficas convencionais digitalizadas e digitais em um modelo de defeito crítico em animais de pequeno porte. Tendo em vista as limitações desse estudo, novos trabalhos se fazem necessários para comprovar os resultados aqui apresentados.

## **7 CONCLUSÃO**

Conclui-se que:

- O método radiográfico digital possibilitou uma melhor avaliação do reparo tecidual em defeito crítico em calvária de rato, preenchido com HA e/ou selante de fibrina, quando submetidos à dieta convencional.
- O método radiográfico digital possibilitou uma melhor avaliação do reparo tecidual em defeito crítico em calvária de rato, preenchido com HA e/ou selante de fibrina, quando submetidos à terapia com ranelato de estrôncio.
- Em relação às ferramentas de análise de imagem, a avaliação por valores equivalentes em mmAl foi superior às demais em detectar diferenças sutis de densidade entre os grupos, por ambos os métodos radiográficos.

## REFERÊNCIAS

ABIRAMAN, S. et al. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. **Biomaterials**, Inglaterra, v.23, n.14, p.3023-3031, jul. 2002.

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.60, n.10, p.1176-1181, out. 2002.

ALMEIDA, C.A.P. et al. **Prontuário odontológico**: uma orientação para o cumprimento da exigência contida no inciso VIII do art. 5º do Código de Ética Odontológica. Rio de Janeiro. 2004. Disponível em: <[http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/prontuario\\_2004.pdf](http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/prontuario_2004.pdf)> Acesso em: 10 maio 2010.

ALMEIDA, S.M. et al. Avaliação da qualidade das imagens digitais adquiridas com diferentes resoluções em um sistema de armazenamento de fósforo. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.14, n.3, p. 262-267, jul./set. 2000.

ALMEIDA, S.M. et al. Avaliação de três métodos radiográficos (periapical convencional, periapical digital e panorâmico) no diagnóstico de lesões apicais produzidas artificialmente. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.15, n.1, p. 56-63, jan./mar. 2001.

ALMEIDA, S.M. et al. Image quality in digital radiographic systems. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.14, n.2, p.136-141, 2003.

AMMANN, P. et al. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **J Bone Miner Res**, Washington DC, v.19, n.12, p.2012-2020, 2004.

ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v.35, n.2, p.191-198, 2006.

BAKHOS, D. et al. Three-dimensional modeling of the temporal bone for surgical training. **Otol Neurotol**, Hagerstown, v.31, n.2, p.328-334, fev. 2010.

BAKSI, B.G.; SEN, B.H.; EYUBOGLU, T.F. Differences in aluminum equivalent values of endodontic sealers: conventional versus digital radiography. **J Endod**, Nova York, v.34, n.9, p.1101-1104, set. 2008.

BARRETO, I.C. **Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos.** 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.

BEHNAMGHADER, A. et al. Phase development and sintering behaviour of biphasic HA-TCP calcium phosphate materials prepared from hydroxyapatite and bioactive glass. **J Mater Sci Mater Med**, Norwell, v.19, n.1, p.197-201, jan. 2008.

BELTRAME, F. et al. A simple non invasive computerized method for the assessment of bone repair within osteoconductive porous bioceramic grafts. **Biotechnol Bioeng**, Nova York, v.92, n.2, p.189-198, out. 2005.

BERKHOUT, W.E.R. et al. The dynamic range of digital radiographic systems: dose reduction or risk of overexposure? **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.33, n.1, p.1-5, jan. 2004.

BIANCHI, A. et al. Facial soft tissue esthetic predictions: validation in craniomaxillofacial surgery with cone beam computed tomography data. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.68, n.7, p.1471-1479, jul. 2010.

BITTAR-CORTEZ, J.A. et al. Comparison of peri-implant bone level assessment in digitized conventional radiographs and digital subtraction images. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.35, n.4, p.258-262, jul. 2006.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, Nova York, v.42, n.1, p.129-138, jan. 2008.

BOSCOLO, F.N. et al. Estudo clínico comparativo da qualidade de imagens de três sistemas radiográficos digitais, filme E-speed e filme digitalizado. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.15, n.4, p. 327-333, out./dez. 2001.

BOZZO, R.O. et al. Linear density analysis of bone repair in rats using digital direct radiograph. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v.12, n.4, p. 317-321, 2004.

BRAYE, F. et al. Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hydroxyapatite. **Biomaterials**, Inglaterra, v.17, n.13, p.1345-1350, jul. 1996.

BRENNAN, T.C. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **Br J Pharmacol**, Londres, v.157, n.7, p.1291-1300, ago. 2009.

BROWN, O. et al. Sintering of biphasic calcium phosphates. **J Mater Sci Mater Med**, Norwell, v.21, n.8, p.2271-2279, ago. 2010.

BRUYERE, O. et al. Relationship between bone mineral density changes and fracture risk reduction in patients treated with strontium ranelate. **J Clin Endocrinol Metab**, Chevy Chase, v.92, n.8, p.3076-3081, ago. 2007.

BURASTERO, G. et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. **Bone**, Nova York, v.47, n.1, p.117-126, jul. 2010.

CAMPOS, S.D. et al. Biomateriais à base de Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade. **Cerâmica**, São Paulo, v.51, n.319, p.274-279, 2005.

CANO, J. et al. High resolution image in bone biology I. Review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.12, n.6, p.E454-458, 2007.

CANO, J. et al. High resolution image in bone biology II. Review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.13, n.1, p.E31-35, 2008.

CARDOSO, A.K. et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells, tissues, organs**, Basel, v.184, n.3-4, p.128-137, 2006.

CARNEIRO, L.S. et al. In vivo study of pixel grey-measurement in digital subtraction radiography for monitoring caries remineralization. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills,, v.38, n.2, p. 73-78, fev. 2009.

CARVALHO, F.B. et al. Evaluation of periapical changes following endodontic therapy: digital subtraction technique compared with computerized morphometric analysis. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.38, n.7, p.438-444, out. 2009.

CEBESOIY, O. et al. Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. **Joint Bone Spine**, Paris, v.74, n.6, p.590-593, 2007.

CHEN, K.-Y. et al. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, Inglaterra, v.30, n.9, p. 1682-1688, mar. 2009.

CHILVARQUER, I. et al. Radiografia Digital. In: PANELLA, J. **Fundamentos de odontologia: radiologia odontológica e imaginologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.21, p.293 – 303.

CHOI, J.H. et al. Bone density measurement in interdental areas with simulated placement of orthodontic miniscrew implants. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, St. Louis, v.136, n.6, p.766.e1-12, dez. 2009.

COSTA E SILVA, A.P.; ANTUNES, J.L.; CAVALCANTI, M.G. Interpretation of mandibular condyle fractures using 2D- and 3D-computed tomography. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.14, n.3, p.203-208, 2003.

CRUSOÉ-REBELLO, I. et al. Assessment of computerized tomography density patterns of ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.108, n.4, p.604-608, out. 2009.

DAHL, S.G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, Nova York, v.28, n.4, p.446-453, abr. 2001.

DANESH-MEYER, M.J.; CHEN, S.T.; RAMS, T.E. Digital subtraction radiographic analysis of GTR in human intrabony defects. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Chicago, v.22, p.441-449, 2002.

DEAN, A.K. et al. A systems biology approach to the identification and analysis of transcriptional regulatory networks in osteocytes. **BMC Bioinformatics**, Londres, v.10, n.9, p.S5, set. 2009.

DELLINGER, J.G.; WOJTOWICZ, A.M.; JAMISON, R.D. Effects of degradation and porosity on the load bearing properties of model hydroxyapatite bone scaffolds. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v.77, n.3, p.563-571, jun. 2006.

DODDS, R.A. et al. Biomechanical and radiographic comparison of demineralized bone matrix, and a coralline hydroxyapatite in a rabbit spinal fusion model. **J Biomater Appl**, Londres, v.25, n.3, p.195-215, set. 2010.

DOTTO, G.N. et al. Subtração radiográfica – identificação precoce de perdas minerais em esmalte. **Cienc Odontol Bras**, São José dos Campos, v.8, n.1, p. 82-89, jan./mar. 2005.

DOURADO, E.R. **Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio**. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado em Processos de Fabricação) - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2006.

EARTHMAN, J.C. et al. Reconstructive materials and bone tissue engineering in implant dentistry. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.50, n.2, p.229-244, abr. 2006.

EBERHARD, U.; BRODER, M.; WITZKE, G. Stability of Beriplast®P fibrin selant: Storage and reconstitution. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 313, n. 1-2, p. 1-4, abr. 2006.

EBINA, H. et al. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. **Oral Dis**, Copenhagen, v.15, n.4, p. 273-280, mai. 2009.

EDWARDS, S.P. Computer-assisted craniomaxillofacial surgery. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, Maryland Heights, v.22, n.1, p.117-134, fev. 2010.

EFEOGLU, C. et al. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v.47, n.8, p.616-621, dez. 2009.

EFEOGLU, C. et al. Quantitative morphometric evaluation of critical size experimental bone defects by microcomputed tomography. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh,, v.45, n.3, p.203-207, abr. 2007.

ERASO, F.E. et al. Density value means in the evaluation of external apical root resorption: an in vitro study for early detection in orthodontic case simulations. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.36, n.3, p.130-137, mar. 2007.

FALCÃO, A.F.P.; SARMENTO, V.A.; RUBIRA, I.R.F. Valor legal das imagens radiográficas digitais e digitalizadas. **R Ci Méd Biol**, Salvador, v.2, n.2, p.263-268, jul./dez. 2003.

FARMAN, A.G. Fundamentals of image acquisition and processing in the digital era. **Orthod Craniofacial Res**, Oxford, v.6, suppl.1, p.17-22, 2003.

FARRIER, S.L. et al. A comparative study of image quality and radiation exposure for dental radiographs produced using a charge-coupled device and a phosphor plate system. **Int Endod J**, Oxford, v.42, n.10, p.900-907, out. 2009.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.11, n.1, p.E47-51, jan. 2006.

FERRAZ, M.P. et al. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v.81, n.4, p.994-1004, jun. 2007.

FERREIRA, R.I. et al. Assessment of enamel demineralization using conventional, digital, and digitalized radiography. **Braz Oral Res**, São Paulo, v.20, n.2, p.114-119, 2006.

FINOLI, A. et al. Phase transformation behaviour of hydroxyapatite foams subject to heat treatment. **Biomed Mater**, Bristol, v.5, n.1, p.15004, fev. 2010.

FIROOZABADI, R. et al. Qualitative and quantitative assessment of bone fragility and fracture healing using conventional radiography and advanced imaging technologies--focus on wrist fracture. **J Orthop Trauma**, Hargestown, v.22, n.8(suppl), p.S83-90, sep. 2008.

FONSECA, A.A. et al. Effect of 10% formalin on radiographic optical density of bone specimens. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.37, n.3, p.137-141, mar. 2008.

FREITAS, P. et al. Reproducibility of pixel values for two photostimulable phosphor plates in consecutive standardized scannings. **Braz Oral Res**, São Paulo, v.20, n.3, p. 207-213, 2006.

GANZ, S.D. Computer-aided design/computer-aided manufacturing applications using CT and cone beam CT scanning technology. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.52, n.4, p.777-808, out. 2008.

GARIB, D.G. et al. Tomografia computadorizada de feixe cônico (Cone beam): entendendo este novo método de diagnóstico por imagem com promissora aplicabilidade na Ortodontia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá, v.12, n.2, p.139-156, mar./abr. 2007.

GENANT, H.K.; JIANG, Y. Advanced imaging assessment of bone quality. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1068, p.410-428, 2006.

GEOFFROY, V. et al. Strontium ranelate decreases the incidence of new caudal vertebral fractures in a growing mouse model with spontaneous fractures by improving bone microarchitecture. **Osteoporos Int**, Londres, v.22, n.1, p.289-297, jan. 2011.

GIBBS, S.J. Radiology: closing a century, opening a millennium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.81, n.5, p.603-606, mai. 1996.

GOGA, R.; CHANDLER, N.P.; LOVE, R.M. Clarity and diagnostic quality of digitized conventional intraoral radiographs. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.33, n.2, p.103-107, mar. 2004.

GOMES, M.E. **A Bone tissue engineering strategy based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor**. 2004. 198f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Universidade do Minho, Portugal, 2004.

GRIFFITH, J.F.; ENGELKE, K.; GENANT, H.K. Looking beyond bone mineral density: Imaging assessment of bone quality. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1192, n.1, p.45-56, mar. 2010.

GRYNPAS, M.D. et al. Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. **Bone**, Nova York, v.18, n.3, p.253-259, mar. 1996.

GUERRERO, M.E. et al. State-of-the-art on cone beam CT imaging for preoperative planning of implant placement. **Clin Oral Investig**, Berlim, v.10, n.1, p.1-7, mar. 2006.

GUIMARÃES, M.C.M. et al. Digital subtraction radiographic analysis of the combination of bioabsorbable membrane and bovine morphogenetic protein pool in human periodontal infrabony defects. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v.18, n.4, p.379-384, jul-ago. 2010.

GUTTENBERG, S.A. Oral and maxillofacial pathology in three dimensions. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.52, n.4, p.843-873, out. 2008.

HABERMANN, B. et al. Strontium ranelate enhances callus strength more than PTH 1-34 in an osteoporotic rat model of fracture healing. **Calcif Tissue Int**, Nova York, v.86, n.1, p.82-89, jan. 2010.

HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1092, p.385-396, dez. 2006.

HAITER-NETO, F. et al. Linear and logarithmic subtraction for detecting enamel subsurface demineralization. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.34, n.3, p.133-139, 2005.

HANSON, N.A.; BAGI, C.M. Alternative approach to assessment of bone quality using micro-computed tomography. **Bone**, Nova York, v.35, n.1, p.326-333, jul. 2004.

HASHEMI, H.M.; JAVIDI, B. Comparison between interpositional bone grafting and osteogenic alveolar distraction in alveolar bone reconstruction. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.68, n.8, p.1853-1858, ago. 2010.

HILDEBOLT, C.F. et al. Alveolar bone measurement precision for phosphor-plate images. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.108, n.3, p.e96-107, set. 2009.

HING, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philos Transact A Math Phys Eng Sci**, Londres, v.362, n.1825, p.2821-2850, dez. 2004.

HINTZE, H.; WENZEL, A.; FRYDENBERG, M. Accuracy of caries detection with four storage phosphor systems and E-speed radiographs. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.31, n.3, p.170-175, 2002.

HOLSTEIN, J.H. et al. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. **J Orthop Trauma**, Hagerstown, v.23, suppl.5, p.S31-38, mai-jun. 2009.

HUA, Y. et al. Bone quality assessment based on cone beam computed tomography imaging. **Clin Oral Impl Res**, Copenhagen, v.20, n.8, p.767-771, ago. 2009.

HUH, J.Y. et al. The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.101, n.4, p.426-431, abr. 2006.

INTINI, G. et al. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. **J Periodontol**, Chicago, v.79, p. 1217-1224, jul. 2008.

JEGOUX, J. et al. In vivo biological performance of composites combining micro-macroporous biphasic calcium phosphate granules and fibrin sealant. **Arch Orthop Trauma Surg**, Berlim, v.125, n.3, p.153-159, 2005.

JIANG, T. et al. Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies. **Acta Biomater**, Oxford, v.6, n.9, p.3457-3470, set. 2010.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J Dent Educ**, Washington, v.65, n.5, p.456-462, 2001.

KIM, S.-S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Inglaterra, v.27, n.8, p. 1399-1409, mar. 2006.

KITAGAWA, H. et al. Comparison of three intra-oral storage phosphor systems using subjective image quality. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.29, n.5, p.272-276, sep. 2000.

KLEIN, M. et al. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v.20, n.1, p.67-74, jan. 2009.

KNACKSTEDT, M.A. et al. Structure and properties of clinical coralline implants measured via 3D imaging and analysis. **Biomaterials**, Inglaterra, v.27, n.13, p.2776-2786, mai. 2006.

KNESER, U. et al. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **J Cell Mol Med**, Londres, v.10, n.1, p.7-19, 2006.

KOBAYASHI, F. et al. A study of volumetric visualization and quantitative evaluation of bone trabeculae in helical CT. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.32, n.3, p.181-185, mai. 2003.

KOCHI, G. et al. Analysis on the guided bone augmentation in the rat calvarium using a microfocus computerized tomography analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.107, p.e42-e48, 2009.

LAMBRECHT, J.T. et al. Generation of three-dimensional prototype models based on cone beam computed tomography. **Int J Comput Assist Radiol Surg**, Heidelberg, v.4, n.2, p.175-180, mar. 2009.

LE GUÉHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **Eur Cell Mater**, Glasgow, v.8, p.1-11, 2004.

LE NIHOANNEN, D. et al. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. **J Mater Sci Mater Med**, Norwell, v.18, n.2, p.225-235, fev. 2007.

LEE, L.T. et al. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. **J Chin Med Assoc**, Taipei, v.71, n.2, p.66-73, fev. 2008.

LEE, M.J. et al. Effect of hydroxyapatite on bone integration in a rabbit tibial defect model. **Clin Orthop Surg**, Seoul, v.2, n.2, p.90-97, jun. 2010.

LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.395, p. 81-98, 2002.

LI, C.; PARIS, O. et al. Strontium is incorporated into mineral crystals only in newly formed bone during strontium ranelate treatment. **J Bone Miner Res**, Washington, v.25, n.5, p.968-975, mai. 2010.

LI, Y. et al. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. **J Orthop Res**, Hoboken, v.28, n.5, p.578-582, mai. 2010.

LI, Y.F. et al. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. **Osteoporos Int**, Londres, v.21, n.11, p.1889-1897, nov. 2010.

LIU, C.; HAN, Z.; CZERNUSKA, J.T. Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization. **Acta Biomater**, Oxford, v.5, n.2, p. 661-669, fev. 2009.

LOUZADA, M.J.Q. et al. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, Piracicaba, v.13, n.1, p.33-38, 2001.

LOUZADA, M.J.Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo in vitro**. 1994. 213f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica, Campinas, 1994.

LU, M.; RABIE, A.B. Microarchitecture of rabbit mandibular defects grafted with intramembranous or endochondral bone shown by micro-computed tomography. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v.41, n.6, p.385-391, dez. 2003.

MAÏMOUN, L. et al. Strontium ranelate improves implant osseointegration. **Bone**, Nova York, v.46, n.5, p.1436-1441, mai. 2010.

MALAFAYA, P.B.; REIS, R.L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. **Acta Biomater**, Oxford, v.5, n.2, p.644-660, fev. 2009.

MARINS, L.V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v.12, n.1, p. 62-69, jan./mar. 2004.

MARTINS, M.V. et al. Evaluation of digital optical density of bone repair in rats medicated with Ketoprofen. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.16, n.3, p. 207-212, 2005.

MEIJER, G.J. et al. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. **Biomaterials**, Inglaterra, v.29, n.21, p.3053-3061, jul. 2008.

MELO, D.P. et al. Effect of alternative photostimulable phosphor plates erasing times on subjective digital image quality. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.39, n.1, p.23-27, jan. 2010.

MIGUEL, F.B. et al. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v.78, n.2, p.334-339, 2006.

MORAES, M.E.L. et al. Avaliação da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos à castração utilizando imagens digitais. **Rev ABRO**, Piracicaba, v.9, n.2, p.11-16, 2008.

MORAES, M.E.L. et al. Estudo radiográfico da reparação óssea em tíbias de ratos estressados: densidade óptica por meio de radiografia digital. **Rev Odonto Cienc**, Porto Alegre, v.20, n.49, p. 257-261, jul./set. 2005.

MUNAR, M.L. et al. Effects of sintering temperature over 1,300 degrees C on the physical and compositional properties of porous hydroxyapatite foam. **Dent Mater J**, Tokio, v.25, n.1, p.51-58, mar. 2006.

NAGEM FILHO, H. et al. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations implant journal – Biomaterials and esthetics**, São Paulo, v.1, n.1, mai. 2006.

NAITOH, M.; HIRUKAWA, A.; KATSUMATA, A.; ARIJI, E. Prospective study to estimate mandibular cancellous bone density using large-volume cone-beam computed tomography. **Clin Oral Impl Res**, Copenhagen, v.21, n.12, p.1309-1313, dez. 2010.

NICOPOULOU-KARAYIANNI, K. et al. Image processing for enhanced observer agreement in the evaluation of periapical bone changes. **Int Endod J**, Oxford, v.35, n.7, p.615-622, jul. 2002.

NIEMEYER, P. et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. **Biomaterials**, Inglaterra, v.31, n.13, p.3572-3579, mai. 2010a.

NIEMEYER, P. et al. Xenogenic transplantation of human mesenchymal stem cells in a critical size defect of the sheep tibia for bone regeneration. **Tissue Eng Part A**, New Rochelle, v.16, n.1, p.33-43, jan. 2010b.

OKAZAKI, A. et al. Osseous tissue reaction around hydroxyapatite block implanted into proximal metaphysis of tibia of rat with collagen-induced arthritis. **Biomaterials**, Inglaterra, v.21, n.5, p.483-487, mar. 2000.

OLIVEIRA, S.M. et al. Characterization of polymeric solutions as injectable vehicles for hydroxyapatite microspheres. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v.11, n.2, p.852-858, jun. 2010.

OSATHANON, T. et al. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Inglaterra, v.29, n.30, p. 4091-4099, out. 2008.

OZTURAN, K.E. et al. Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. **J Orthop Res**, Hoboken, v.29, n.1, p.138-142, jan. 2011.

PARK, J-W. et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clin Oral Impl Res**, Copenhagen, v.20, p.372-378, 2009.

PARKS, E.T.; WILLIAMSON, G.F. Digital radiography: An overview. **J Contemp Dent Pract**, Cincinnati, v.3, n.4, p. 23-39, nov. 2002.

PERKA, C. et al. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. **Biomaterials**, Inglaterra, v.21, n.11, p.1145-1153, jun. 2000.

PETRIE ARONIN, C.E. et al. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v.89, n.3, p.632-641, jun. 2009.

PRECHEUR, H.V. Bone graft materials. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.51, n.3, p. 729-746, jul. 2007.

PRYOR, M.E.; SUSIN, C.; WIKESJÖ, U.M. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.33, n.6, p.455-460, jun. 2006.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clin Chem**, Washington, v.45, n.8(B), p.1353-1358, 1999.

REBAUDI, A. et al. Preoperative evaluation of bone quality and bone density using a novel CT/microCT-based hard-normal-soft classification system. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.25, n.1, p.75-85, jan-fev. 2010.

RIBEIRO, C.C.; BARRIAS, C.C.; BARBOSA, M.A. Preparation and characterization of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. **J Mater Sci: Mater Med**, Londres, v.17, n.5, p. 455-463, 2006.

ROSA, A.L.; SHAREEF, M.Y.; van NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.14, n.3, p.273-277, jul./set. 2000.

RUPRECHT, A. Oral and maxillofacial radiology: then and now. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.139, Suppl:5S-6S, jun. 2008.

RUSCHE, B. The 3Rs and animal welfare - conflict or the way forward? **ALTEX**, Heidelberg, v.20, n.1, p.63-76, 2003.

SAADEH, P.B. et al. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. **J Craniofac Surg**, Boston, v.12, n.6, p.573-579, nov. 2001.

SAKAKURA, C.E. et al. Radiographic assessment of bone density around integrated titanium implants after ovariectomy in rats. **Clin Oral Impl Res**, Copenhagen, v.17, p.134-138, 2006.

SARKAR, M.R. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. **Biomaterials**, Inglaterra, v.27, n.9, p.1817-1823, mar. 2006.

SCARFE, W.C.; FARMAN, A.G. What is cone-beam CT and how does it work? **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.52, n.4, p.707-730, out. 2008.

SCHÖNBERGER, T. et al. A novel software-based evaluation method for objective quantification of bone regeneration in experimental bone defects. **Eur Cell Mater**, Glasgow, v.14, suppl.1, p.92, 2007.

SCHÖNBERGER, T. et al. Novel software-based and validated evaluation method for objective quantification of bone regeneration in experimental bone defects. **Z Orthop Unfall**, Stuttgart, v.148, n.1, p.19-25, jan. 2010.

SHAPURIAN, T. et al. Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.21, n.2, p.290-297, mar-abr. 2006.

SHEN, H. et al. An injectable scaffold: rhBMP-2-loaded poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite microspheres. **Acta Biomater**, Oxford, v.6, n.2, p.455-465, fev. 2010.

SILA-ASNA, M. et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. **Kobe J Med Sci**, Kobe, v.53, n.1-2, p.25-35, 2007.

SILVA, A.R.S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. **Rev Odonto Cienc**, Porto Alegre, v.22, n.55, p. 77-81, jan./mar. 2007.

SOUTHARD, T.E. et al. Geometric and densitometric standardization of intraoral radiography through use of a modified XCP system. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.87, p.253-257, 1999.

SPIN NETO, R. **Desenvolvimento e aplicação de biomateriais à base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica**. 2008. 130f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia, Araraquara, 2008.

STEINBERG, E.L.; STERNHEIM, A.; BLACHAR, A. Femoral head density on CT scans of patients following hip fracture fixation by expandable proximal peg or dynamic screw. **Injury**, Amsterdam, v.41, n.6, p.647-651, jun. 2010.

SUN, J.S. et al. Collagen-hydroxyapatite/tricalcium phosphate microspheres as a delivery system for recombinant human transforming growth factor-beta 1. **Artif Organs**, Cambridge, v.27, n.7, p.605-612, jul. 2003.

SYRIOPOULOS, K. et al. Radiographic detection of approximal caries: a comparison of dental films and digital imaging systems. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.29, n.5, p.312-318, 2000.

TABA JÚNIOR, M. et al. Radiographic evaluation of dental implants with different surface treatments: an experimental study in dogs. **Implant Dent**, Baltimore, v.12, n.3, p.252-258, 2003.

TAGA, M.L. et al. Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.23, n.3, p.427-436, mai-jun. 2008.

TAKANE, M. et al. Clinical application of cone beam computed tomography for ideal absorbable membrane placement in interproximal bone defects. **J Oral Sci**, Tokio, v.52, n.1, p.63-69. 2010.

TRÉ, F.D. et al. Development of a novel digital subtraction technique for detecting subtle changes in jawbone density. **Clin Oral Investig**, Berlim, v.10, p.235-248, 2006.

TURKYILMAZ, I. et al. Determination of bone quality of 372 implant recipient sites using Hounsfield unit from computerized tomography: a clinical study. **Clin Implant Dent Relat Res**, Hamilton, v.10, n.4, p.238-244, dez. 2008.

VAN DER STELT, P.F. Better imaging: The advantages of digital radiography. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.139, n.6(supplement), p.7S-13S, jun. 2008.

VERBERCKMOES, S.C. et al. Effects of strontium on the physicochemical characteristics of hydroxyapatite. **Calcif Tissue Int**, Nova York, v.75, n.5, p.405-415, nov. 2004.

VERBERCKMOES, S.C.; DE BROE, M.E.; D'HAESE, P.C. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. **Kidney Int**, Nova York, v.64, n.2, p.534-543, ago. 2003.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.50, n.2, p. 175-190, abr. 2006.

WANG, Y.J. et al. Collagen-hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenic protein-4. **Artif Organs**, Cambridge, v.27, n.2, p.162-168, fev. 2003.

WEBER, A.L. History of head and neck radiology: Past, present and future. **Radiology**, Easton, v. 218, n.1, p. 15-24, jan. 2001.

WENISCH, S. et al. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v.67, n.3, p.713-718, dez. 2003.

WHITE, S.C.; PHAROAH, M.J. Processamento do filme radiográfico. In: WHITE, S.C.; PHAROAH, M. J. **Radiologia oral: fundamentos e interpretação**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.95-110.

WHITE, S.C.; PHAROAH, M.J. The evaluation and application of dental maxillofacial imaging modalities. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.52, n.4, p. 689-705, out. 2008.

YACUBIAN-FERNANDES, A. et al. Prototipagem como forma alternativa para realização de cranioplastia com metilmetacrilato. **Arq Neuropsiquiatr**, São Paulo, v.62, n.3-B, p.865-868, 2004.

YOUNG, S. et al. Oral and maxillofacial surgery. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of tissue engineering**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap.71, p.1079-1094.

YU, H. et al. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. **Biomaterials**, Inglaterra, v.30, n.4, p.508-517, fev. 2009.

YUN, J.I. et al. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.37, n.5, p.419-426, mai. 2010.

ZHANG, J. et al. Biological properties of a biomimetic membrane for guided tissue regeneration: a study in rat calvarial defects. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v.21, n.4, p.392-397, abr. 2010a.

ZHANG, J.C. et al. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: an experimental study in rabbit mandibles. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v.39, n.5, p.469-477, mai. 2010b.

ZHOU, L.B. et al. Accurate Reconstruction of Discontinuous Mandible Using a Reverse Engineering/Computer-Aided Design/Rapid Prototyping Technique: A Preliminary Clinical Study. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.68, n.9, p.2115-2121, set. 2010.

ZHUKAUSKAS, R. et al. Histological and radiographic evaluations of demineralized bone matrix and coralline hydroxyapatite in the rabbit tibia. **J Biomater Appl**, Londres, v.24, n.7, p.639-656, mar. 2010.

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



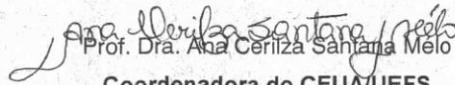
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**  
 Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -  
 Fone: (75) 3224-8398

Feira de Santana, 26 de agosto de 2009.

### PARECER

O projeto N° 003/2009, "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, RADIOGRÁFICA E BIOQUÍMICA DA UTILIZAÇÃO DE MICROSFERAS DE HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATO", de autoria dos estudantes: Ana Clara Alves de Carvalho, Isabela Cerqueira Barreto, Luciana Soares de Almeida Freitas Oliveira e Marion Alves do Nascimento, sob a orientação dos professores Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior e Dra. Fabiana Paim Rosa, incluiu na versão final as modificações e correções encaminhados pelo parecerista (1º e 2º pareceres), as quais foram aceitas pela autora no Item Objetivo Geral e no Formulário do Protocolo Experimental.

Diante do exposto, sou **favorável** à execução do projeto, conforme reunião de conselho do CEUA/UEFS do dia 26 Agosto de 2009.

  
 Prof. Dra. Ana Cerilza Santana Melo

**Coordenadora do CEUA/UEFS**

**Port. 497/2008**

Prof.ª Dr.ª Ana Cerilza Santana Melo  
 Coordenadora do CEUA  
 Comitê de Ética no Uso de Animais  
 CEUA/UEFS  
 Port. 497/2008