

## Avaliação morfológica por imagem microtomográfica e histológica do reparo ósseo após o uso de biomaterial

### *Morphological and histological evaluation by microtomographic image of bone repair after the use of biomaterial*

Anderson Cunha dos Santos<sup>1\*</sup>, Iorrana Índira dos Anjos Ribeiro<sup>1</sup>, Fabiana Paim Rosa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – ICS/UFBA; <sup>2</sup>Doutora. Professora Adjunta da Graduação e Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – ICS/UFBA.

#### Resumo

**Introdução:** a avaliação do reparo de defeitos ósseos críticos com o uso de biomaterial, a microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT) é um método de análise promissor e a histologia um método clássico. Quando a capacidade de reparo ósseo espontânea torna-se limitada, faz-se necessário o uso de biomaterial, a exemplo da hidroxiapatita (HA) que é utilizada por sua biocompatibilidade, similaridade com o tecido ósseo e por haver vários tipos disponíveis comercialmente. **Objetivo:** avaliar morfológicamente por  $\mu$ CT e por histologia o reparo ósseo após o uso de biomaterial. **Metodologia:** utilizou-se 15 ratos Wistar para compor os três grupos experimentais: HA implantado hidroxiapatita bovina (BioOss<sup>®</sup>), DV sem implantação de biomaterial e CI calvária íntegra, avaliados no ponto biológico de 15 dias. **Resultados:** a avaliação pela  $\mu$ CT permitiu observar a estrutura óssea e o preenchimento do defeito confeccionado. No grupo HA observou-se que o biomaterial e o osso são morfológicamente diferentes em densidade e microarquitetura. No grupo DV, o defeito apresenta contornos bem definidos e sem presença de tecido ósseo na área de preenchimento. No grupo CI visualizou-se a estrutura da calvária íntegra e suas suturas intracranianas. Em ambas as técnicas, as análises quantitativas da  $\mu$ CT e morfometria, observou-se que a calvária íntegra é a que possui maior percentual de tecido ósseo. **Conclusão:** ambas as técnicas mostraram-se complementares e foram eficazes para avaliar o reparo ósseo.

**Palavras-chave:** Microtomografia por raio-X. Durapatita. Biomateriais.

#### Abstract

**Introduction:** in the evaluation of repair critical defects using biomaterial computed microtomography ( $\mu$ CT) is a promising method of analysis and histology standard procedures. When spontaneously the bone repair capacity becomes limited, it is necessary the use of biomaterials, such as hydroxyapatite (HA) that is used by its biocompatibility, similarity to bone tissue and have various commercially available. **Objective:** to evaluate morphologically by  $\mu$ CT and histology bone healing after using biomaterial. **Methodology:** we used 15 Wistar rats, to compose the three experimental groups: HA implanted bovine hydroxyapatite (BioOss<sup>®</sup>), DV without implantation of biomaterial and CI calvaria part, evaluated in the biological point of 15 days. **Results:** the evaluation by  $\mu$ CT allowed to observe the bone structure and filling the defect made. In the group HA it was observed that the biomaterial and the bone are morphologically different in density and microarchitecture. DV group the defect has well defined contours and without the presence of bone tissue in the fill area. In the CI group visualized the structure of the entire calvaria and its intracranial sutures. In both techniques the quantitative analyzes, and  $\mu$ CT morphometric analysis, it was observed that the entire calvaria is the one with the highest percentage of bone tissue. **Conclusion:** both techniques proved to be complementary and have been effective to assess bone repair.

**Keywords:** X-Ray microtomography. Durapatite. Biomaterials.

#### INTRODUÇÃO

A alta resolução das técnicas de imagem tridimensionais (3D), como a microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT), possibilita a avaliação de massa óssea, a densidade e a morfologia dos espécimes excisados. A  $\mu$ CT trouxe como vantagens a medição direta da morfologia trabecular em 3D e uma análise de um volume significativamente maior da mesma amostra. Assim, medições podem ser realizadas com um tempo muito mais rápido do que as

típicas análises histológicas de parâmetros histomorfométricos e possibilita a utilização de amostras de osso não descalcificadas, ademais a avaliação da morfologia óssea por varrimento de  $\mu$ CT não é destrutiva (BOUXSEIN et al., 2010; KASSECK et al., 2010; LUSSANI et al., 2015).

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

**Correspondente / Corresponding:** \*Anderson Cunha dos Santos. Secretária do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n – Vale do Canela. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: cunhaanderson84@gmail.com Tel.: (71) 3283-8959.

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

Com o propósito de formar, recuperar e/ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas configurações anatômicas, inúmeras pesquisas são realizadas com a meta de desenvolver ou aperfeiçoar novos materiais biocompatíveis e que apresentam propriedades de condução óssea, os quais favorecem o reparo dos defeitos ósseos (GUIMARÃES et al., 2011). O emprego de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma opção aos enxertos ósseos, é vantajoso por não prejudicar tecidos saudáveis, por reduzir os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponíveis comercialmente. Alguns são de fácil dissolução e absorção que, concomitantemente, permitem e estimulam a formação óssea (OLIVEIRA et al., 2010).

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

Tendo em vista, potencialidades e características da  $\mu$ CT e das análises histológicas na avaliação de reparos ósseos, este trabalho tem como objetivo avaliar morfológicamente por imagem microtomográfica e por microscopia de luz comum o reparo ósseo após o uso de biomaterial.

## METODOLOGIA

### Aspectos éticos

Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (PROTOCOLO Nº060/2014) e seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008).

### Amostra

Foram utilizados 15 ratos da linhagem *Wistar*, machos, adultos, com massa corpórea entre 350 e 400g. Estes foram fornecidos, criados e mantidos pelo biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e receberam ração sólida e água *ad libitum*, durante todo o experimento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente

para compor os três grupos: **HA**, defeito ósseo crítico preenchido com biomaterial de hidroxiapatita bovina em formato de grânulos (BioOss®); **DV**, defeito ósseo crítico e sem implantação de biomaterial; e **CI**, calvária íntegra e sem confecção de defeito crítico. Cada grupo foi composto por cinco animais, avaliados no ponto biológico de 15 dias.

### Procedimento Cirúrgico e Etapa Laboratorial

Os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (0,06 mL/kg) e cloridrato de cetamina (0,12 mL/kg). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia e antisepsia com álcool iodado da região da calvária e, posteriormente, foi confeccionado um defeito ósseo crítico de aproximadamente 8,5mm de diâmetro na porção mediana da calvária, com uma fresa trefina. Este defeito foi preenchido de acordo os grupos pré-estabelecidos. Ao atingir o ponto biológico de 15 dias os animais sofreram eutanásia por aprofundamento da anestesia. As calvárias foram retiradas com remoção de todo tecido mole, fixadas em solução de formol tamponado a 4% e conservadas em álcool a 70% para serem encaminhadas à análise microtomográfica e, posteriormente, para processamento histológico.

### Análise por Microtomografia Computadorizada ( $\mu$ CT)

As amostras foram digitalizadas no Microtomógrafo *in vivo* SkyScan 1176, cortes de 09 $\mu$ m de espessura (filtro de alumínio de 0,5mm, kilovoltagem de 50kV e miliampereagem de 497mA). As imagens radiográficas foram reconstituídas pelo uso do *software NRecon*. Redirecionadas no *Data Viewer* e analisadas em 3D pelo programa *CTan*. No *CTan*, foi selecionada a região de interesse da calvária (ROI), feita a morfometria (plano axial, a partir do maior diâmetro do defeito, similar ao corte histológico) e confeccionada a imagem delimitada em 3D. Os parâmetros morfométricos obtidos pelo *CTan* foram: Volume de tecido ósseo (quantidade de tecido mineralizado presente no interior do defeito), Percentagem de tecido ósseo (obtida pela razão entre o volume de tecido ósseo e o volume total) e Superfície de contato ósseo (área superficial do tecido mineralizado que esta interconectada). As imagens tridimensionais formadas no *CTan* foram manipuladas no programa *CTvox*, para ajustes de detalhes.

### Processamento histológico

Após as análises microtomográficas, as calvárias foram reduzidas na região de maior diâmetro, descalcificadas com EDTA – 5% por sete dias e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 4 $\mu$ m de espessura. Os cortes histológicos foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE), Picrossírius vermelho (PIFG) e Tricrômico de Masson-Goldner (Goldner).

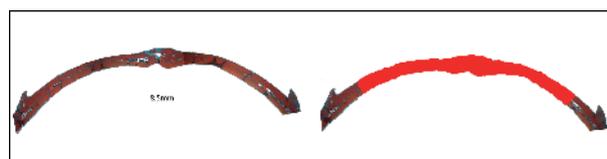
### Análise Histomorfométrica

Os cortes foram analisados histologicamente em microscópio de luz comum Leica® DM 1000 e as imagens foram capturadas a partir da câmera fotográfica Leica® DFC 310 FX acoplada ao microscópio. Para a avaliação

morfométrica, foi utilizado o Sistema de Análise de Processamento de Imagens, Leica QWin®.

Como padrão ouro para a análise morfométrica utilizou-se o grupo CI com o valor estabelecido como 100% do volume da área de ocupação anatômica da região de interesse. Esta região corresponde a morfologia do defeito ósseo que foi confeccionado nos demais grupos. Para tanto, mediu-se inicialmente uma extensão linear de 8,5mm na calvária íntegra e, a partir da delimitação desta extensão, mediu-se a área de ocupação (ACI) equivalente ao defeito crítico (Figura 1).

**Figura 1** – Área de ocupação na calvária íntegra equivalente a área de preenchimento do defeito crítico



*Legenda:* (A) Delimitação da extensão linear de 8,5mm. (B) Área de ocupação equivalente a área total de preenchimento do defeito crítico

**Fonte:** Dos autores

Os seguintes parâmetros foram mensurados por meio da morfometria: (1) percentagem de área total (AT%) – proporção de área total de preenchimento do defeito relativa a ACI; (2) percentagem de área de matriz osteoide (AO%) – proporção de área de matriz osteoide relativa a ACI; (3) percentagem de área de biomaterial (AB%) – proporção de área de biomaterial relativa a ACI; (4) percentagem de outros – proporção dos demais tecidos presentes, relativa a ACI.

## RESULTADOS

### Análise morfológica por microtomografia computadorizada (µCT)

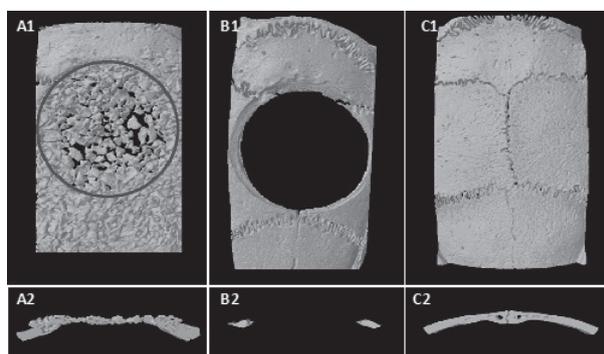
Grupo HA (BioOss®) – No corte anteroposterior do plano coronal foi possível observar uma diferença sutil de densidade, representada por tons de cinza, do osso da borda em relação ao biomaterial, e uma sobreposição de biomaterial além dos limites do defeito (Figura A1). Notou-se que o BioOss® preencheu quase totalmente o defeito ao se comparar as (Figuras 2, A1 e A2) que equivalem ao grupo HA e grupo DV, respectivamente.

Grupo DV (Controle) – Nas Figuras 2 B1 e 2 B2, observou-se que as imagens reproduziram o defeito crítico perfeitamente tridimensionais com discreta neoformação óssea irregular nas margens do defeito, visualizada pela morfologia e os tons de cinza. Ausência de densidade na área central do defeito, mostrada na cor preta, que comprova ausência da neoformação óssea, além dos limites da borda.

Grupo CI (Calvária Íntegra) – Visualizou-se a anatomia da calvária normal, com as suturas intracranianas bem

definidas, sem irregularidades e com uma boa resolução de imagem (Figuras 2C1 e 2C2).

**Figura 2** – Imagens tomográficas dos grupos HA, DV e CI



**Legenda:** Grupo HA – (A1) visão anteroposterior plano coronal, círculo cinza: delimitação do defeito crítico e (A2) corte axial na região de maior diâmetro do defeito. Grupo DV – (B1) visão anteroposterior plano coronal e (B2) corte axial na região de maior diâmetro do defeito. Grupo CI – (C1) visão anteroposterior plano coronal e (C2) corte axial na região de maior diâmetro do defeito

**Fonte:** Dos autores

### Análise morfométrica por microtomografia computadorizada (µCT)

Na Tabela 1, estão descritas as medidas morfométricas obtidas a partir da µCT. A aquisição destas medidas se deu a partir do corte axial, da região referente ao maior diâmetro da calvária, que simula um corte histológico.

O grupo HA apresenta um volume de tecido ósseo maior em relação aos demais grupos e com pouca diferença do grupo CI. A percentagem de tecido ósseo evidenciou-se uma maior quantidade de tecido mineralizado no grupo CI em relação aos demais grupos. Nos parâmetros de volume de tecido ósseo e superfície de contato ósseo, o grupo HA apresenta o maior valor entre os grupos.

**Tabela 1** – Comparação entre as medidas morfométricas dos grupos HA, DV e CI

GRUPOS	MEDIDAS MORFOMÉTRICAS POR µCT					
	Volume tecido ósseo (mm <sup>3</sup> )		% tecido ósseo		Superfície de contato (mm <sup>2</sup> )	
	M	Dp	M	Dp	M	Dp
Grupo HA	5,63	1,94	13,05	4,67	92,24	33,46
Grupo DV	2,06	0,71	5,83	2,02	31,15	12,52
Grupo CI	5,36	0,12	19,79	1,77	45,08	2,55

*Legenda:* M: média e Dp: desvio padrão

**Fonte:** Dos autores

### Análise histomorfológica

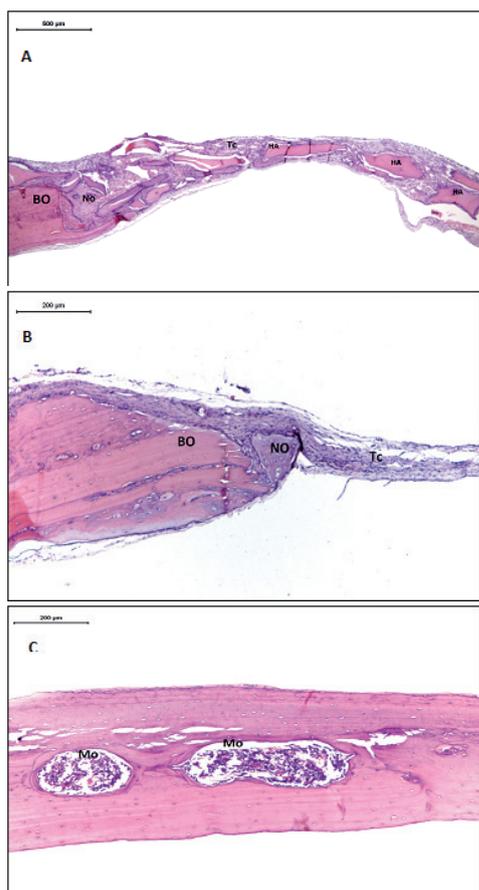
Grupo HA (BioOss®) – As bordas do defeito estavam bem definidas, por vezes em bisel, com neoformação óssea reacional nessas bordas, discretamente ampliadas,

quando há presença de biomaterial particulado nas suas proximidades. O defeito foi preenchido por tecido conjuntivo fibroso, com áreas edemaciadas, e por inúmeros biomateriais particulados de diversos tamanhos, vistos entre duas e cinco camadas. As partículas estavam circundadas por um espaço que as distava do tecido fibroso. Neste tecido fibroso delgado circundante havia uma reação granulomatosa e acentuada proliferação vascular. Em torno dos biomateriais particulados havia proliferação de células fusiformes. Neoformação óssea de matriz osteoide em torno de alguns biomateriais particulados (Figura 3A).

Grupo DV (Controle) – Houve uma neoformação óssea restrita às bordas do defeito do tipo reacional. O defeito foi preenchido por um delgado tecido conjuntivo fibroso, infiltrado inflamatório mononuclear discreto próximo às bordas do defeito, acompanhados de discreta proliferação de capilares sanguíneos. (Figura 3B).

Grupo CI (Calvária Íntegra) – Na calvária íntegra observou-se osso lamelar íntegro, com presença de medula óssea e espessura normal (Figura 3C).

**Figura 3** – Análise histológica dos grupos HA, DV e CI



**Legenda:** (A) Grupo HA (BioOss) 15 dias – região da borda (BO) da calvária com neoformação óssea (NO) reacional, presença de tecido conjuntivo (Tc) em permeio ao biomaterial (HA). HE, 4x, Barra: 500 µm. (B) Grupo DV (Controle) 15 dias – (BO) borda óssea, (NO) neoformação óssea restrita às bordas do defeito do tipo reacional, (Tc) tecido conjuntivo fibroso. HE, 10x, Barra: 200µm. (C) Grupo CI 15 dias – observa-se a presença de lamelas, lacunas de osteócitos e medula óssea (MO). HE, 10x, Barra: 200µm

**Fonte:** Dos autores

### Análise histomorfométrica

O grupo HA apresentou maior percentual de área total do que a calvária íntegra e aumento do percentual de biomaterial, em aproximadamente 71%. A área total do grupo DV foi aquém da calvária íntegra. Os grupos DV e HA apresentaram percentual de área de neoformação óssea inferior ao da calvária íntegra.

**Tabela 2** – Comparação das medidas histomorfométricas entre os grupos experimentais

GRUPOS	MEDIDAS HISTOMORFOMÉTRICAS							
	%AT		%AO		%B		% Outros	
	M	Dp	M	Dp	M	Dp	M	Dp
Grupo CI	100,00	–	84,34	3,86	–	–	15,66	2,27
Grupo HA	152,95	80,38	8,98	5,68	70,96	50,87	73,01	33,84
Grupo DV	35,63	26,38	11,20	5,73	–	–	24,43	19,34

**Legenda:** %AT – percentagem de área total; %AO – percentagem de área de matriz osteoide; %B – percentagem de biomaterial; M – média; e Dp – desvio padrão

**Fonte:** Dos autores

### DISCUSSÃO

O propósito da utilização da  $\mu$ CT como método de avaliação de defeitos ósseos críticos está em obter dados qualitativos e quantitativos do reparo da região após implantação de biomaterial, através de um método não invasivo (SHAUNA et al., 2009). As diferenças morfológicas entre o biomaterial e o tecido ósseo da borda foram sutis no grupo HA, a partir das imagens tridimensionais por  $\mu$ CT e, portanto ratifica o valor desta técnica na obtenção de informações relacionadas a medições geométricas e algumas propriedades físicas dos biomateriais, destacado na literatura pelos autores Bart e Wallace (2013) em seus estudos.

A similaridade entre a densidade do osso da borda e do biomaterial, representada por tons de cinza na  $\mu$ CT, justifica-se pela similaridade entre o BioOss® e o osso da calvária, fator complicador para obtenção de imagens radiográficas (ARAGÓN et al., 2011). Contudo, ainda foi possível diferenciar a morfologia do biomaterial em relação ao osso, em virtude da alta resolução de imagem oferecida pela  $\mu$ CT (SALES et al., 2012; PANG, et al., 2012; ANNIBALI et al., 2014).

A ausência de especificidade, quando da utilização da técnica neste estudo, contribuiu para os valores similares de percentagem de tecido ósseo, entre os grupos HA e CI, uma vez que não foram obtidos previamente os valores de densidade específicos entre biomaterial e osso. O valor similar da percentagem de tecido ósseo, obtido pela morfometria na  $\mu$ CT, entre os grupos HA e CI, não foi conclusiva para afirmar que houve neoformação óssea além da margem do defeito.

A média de equivalência vista pode ter influenciado. A partir da avaliação histomorfométrica, obteve-se uma

média de área total no grupo HA (aproximadamente 152%) acima da área equivalente na calvária íntegra (100%). Este resultado ocorreu devido a implantação de biomaterial além do necessário. Isto pode ter influenciado no percentual de área de neoformação óssea no grupo HA, aproximadamente 8%, já que esta sobreposição de biomaterial pode dificultar processos como a proliferação celular e a neoformação óssea.

O potencial regenerativo do tecido ósseo apresenta limitações em situações peculiares, como, por exemplo, em defeitos ósseos críticos. Assim, o resultado apresentado no grupo controle com uma percentagem de área total (35,63%) aquém da calvária íntegra já era esperado, uma vez que defeitos ósseos com dimensões críticas, sem a implantação de um arcabouço tridimensional, tem sua extensão preenchida por um tecido conjuntivo fibroso, delgado e uma neoformação óssea reparativa restrita a borda (BARRETO, 2011; ROLIM, 2013). Quanto ao grupo HA, sua superioridade em relação ao percentual de área total do defeito ocorreu devido à implantação de biomaterial além do necessário. Esta sobreposição de biomaterial pode dificultar processos como a proliferação celular e a neoformação óssea, e isto pode ter refletido nos valores relacionados à neoformação óssea do grupo HA na histomorfometria.

Embora a  $\mu$ CT garanta uma imagem de ótima qualidade, melhor visualização da microarquitetura óssea como um todo e a localização do biomaterial sob uma ótica tridimensional, existem limitações relacionadas às avaliações de outras estruturas de pouca radio-opacidade como, por exemplo, tecido conjuntivo não mineralizado, células, dentre outras. Estas características podem ser visualizadas por meio da histomorfometria, o que a consolida como uma técnica complementar aos resultados obtidos pela  $\mu$ CT.

Os resultados da  $\mu$ CT e da técnica histológica são similares quanto aos aspectos morfológicos de posicionamento e microarquitetura do biomaterial no defeito ósseo crítico. Contudo, vale ressaltar que este estudo apresenta resultados para o reparo ósseo em sua fase inicial, momento no qual a neoformação óssea ainda se mostrou discreta. O que torna importante a avaliação deste reparo em outros pontos biológicos para uma melhor avaliação destas técnicas. Ademais, a  $\mu$ CT é uma técnica promissora, de fácil reprodução, com destaque para a visualização de defeitos ósseos em diversos planos seccionais (axial, sagital e coronal) e com riqueza de detalhes, de forma rápida e não invasiva.

## CONCLUSÃO

A  $\mu$ CT mostrou-se eficaz para a avaliação da microarquitetura do biomaterial, bem como para a visualização tridimensional do defeito. Já a histologia permitiu avaliar características morfológicas dos tecidos presentes durante o reparo. Desta forma, as técnicas apresentaram-se como complementares para a avaliação do reparo de defeitos ósseos críticos.

## REFERÊNCIAS

- ARAGÓN, J. et al. Development and Characterization of a Novel Bioresorbable and Bioactive Biomaterial Based on Polyvinyl Acetate, Calcium Carbonate and Coralline Hydroxyapatite. **Materials Research**, São Carlos, SP, v. 14, p. 25-30, June./Dez, 2011.
- ANNIBALI, S. et al. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial "critical size" defect: Preliminary data. **J. biomed. mater. res. B appl. Biomater.**, Hoboken, v. 102, n. 4, p. 815-825, May.2014.
- BART, Z. R.; WALLACE, J. M. Microcomputed Tomography Applications in Bone and Mineral Research. **Advances in Computed Tomography**, Delaware, v. 2013, n. 2, p. 121-127, 2013.
- BARRETO, I. C. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biomateriais para regeneração óssea**. 2011. 172 f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- BI, L. et al. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. **J. biomed. mater. res. part. A**, EUA, v. 100, n. 2, p. 3267-3275, 2012.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. **J. bone miner. res.**, Washington DC, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
- GUIMARÃES, K. B. et al. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Braz. j. otorhinolaryngol. (Impr.)**, São Paulo, SP, v. 77, p. 447-454, Jul./Ago 2011.
- KASSECK, C. et al. Comparison of optical coherence tomography, microcomputed tomography, and histology at a three-dimensionally imaged trabecular bone sample. **J. biomed. opt.**, Bellingham, WA, v. 15, n. 4, July./Ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20799821>>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- LUSSANI, F. C. et al. A versatile x-ray microtomography station for biomedical imaging and materials research. **Rev. sci. instrum.**, New York, v. 86, n. 063705, p.1-9, 2015. Disponível em: <<http://scitation.aip.org/content/aip/journal/rsi/86/6/10.1063/1.4922607>>. Acesso em: 15 Ago. 2015.
- NOGUEIRA, L. P. et al. 3D histomorphometric quantification of trabecular bones by computed microtomography using synchrotron radiation. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 990-996, Dec.2010.
- OLIVEIRA, F. P. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Rev. ciênc. méd. biol.**, Salvador, v. 9, p. 37-44, jan./mai., 2010.
- PANG, E et al. Dimensional Micro-Computed Tomography Study on Bone Regeneration with Silk Fibroin, rh-Bone Morphogenetic Protein Loaded-Silk Fibroin and Tricalcium Phosphate Coated-Silk Fibroin in Rat Calvaria Defect. **J. Korean. Assoc. Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.**, Korea, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2012.
- PARK, Y. S. et al. Comparison of alveolar ridge preservation methods using three-dimensional micro-computed tomographic analysis and two-dimensional histometric evaluation. **Imaging. Sci. Dent.**, São Paulo, v. 44, p. 143-148, 2014.
- ROLIM, A. E. H. **Estudo in vivo de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo**. 2013. 215 f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

15. SHAUNA et al. X-ray microcomputed tomography for the measurement of cell adhesion and proliferation in polymer scaffolds. **Biomaterials**, Guildford, v. 30, n. 16, p. 2967-2974, 2009.

16. SALES, E et al. Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence. **Appl. radiat. isot.**, Oxford, v.70, n. 7, p. 1272-1276, July.2012

---

Submetido: 02/10/2015

Aceito em: 15/10/2015